



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2016

Maria Helena Oliveira
Casimiro Correia

Otimização do processo de depuração de moluscos
bivalves

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos académicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2016

**Maria Helena Oliveira
Casimiro Correia**

**Otimização do processo de depuração de moluscos
bivalves**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha, realizada sob a orientação científica do Doutor Rui Miranda Rocha (Investigador em Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro) e co-orientação científica da Doutora Anabela Pereira (Técnica Superior, CESAM, Universidade de Aveiro) e Doutor Ricardo Calado (Investigador Principal do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro).

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo o apoio e dedicação ao longo destes anos.

o júri

presidente

Doutora Ana Isabel Lillebø Batista

Investigadora Principal, Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro

Doutora Jacinta Oliveira

Investigadora em Pós-Doutoramento, Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro (arguente)

Doutor Rui Miranda Rocha

Investigador em Pós-Doutoramento, Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro (orientador)

agradecimentos

Agradeço ao Doutor Rui Miranda Rocha por ter aceite ser meu orientador, por todo o apoio prestado ao longo deste ano e pela oportunidade de participar no projeto Depurplus.

Um agradecimento também ao Doutor Ricardo Calado e Doutora Anabela Pereira, cuja co-orientação foi essencial para as várias etapas deste trabalho.

Não podia deixar de fazer um agradecimento especial às minhas colegas de trabalho, mestres Patrícia Matos, Inês Rosa e Ana Costa, que também tiveram um importante papel de orientação. Um agradecimento também à mestre Inês Rosa pela cedência de algumas fotografias presentes neste documento.

Deixo também um agradecimento à arguente Doutora Jacinta Oliveira, pelo importante contributo ao melhoramento do documento escrito.

Deixo também um agradecimento especial aos amigos de sempre, família, namorado e todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a conseguir atingir este objetivo. Por todo o apoio e carinho o meu muito obrigada!

Resumo

A contaminação microbiológica de moluscos bivalves constitui uma das principais preocupações inerentes à segurança alimentar desta importante fonte de receitas para a economia portuguesa. Os bivalves capturados ou produzidos em zonas estuarinas ou lagunares devem passar por um processo de depuração, para redução dos níveis de contaminação microbiológica, antes da sua comercialização. Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de sistemas modulares de depuração, que apresentem vantagens em relação aos sistemas convencionais, tais como: baixos custos de operação, maior facilidade de controlo do processo de depuração, maior eficácia na desinfecção da água de depuração e maior facilidade de manutenção dos sistemas. Numa primeira fase, foram realizadas três experiências para a otimização de parâmetros de depuração: 1) Otimização da desinfecção da água de depuração dos moluscos bivalves pela manipulação da intensidade ($\mu\text{W.s.cm}^{-2}$) da radiação UV-C aplicada; 2) Otimização da carga biológica a depurar (kg.L^{-1}) e do tempo de depuração; e 3) Avaliação da temperatura e salinidade ótimas para depuração dos moluscos bivalves estudados: berbigão (*Cerastoderma edule*), ostra do pacífico (*Crassostrea gigas*) e amêijoia macha (*Venerupis corrugata*). Posteriormente, testou-se a capacidade máxima de funcionamento da depuradora modular desenvolvida e avaliaram-se os resultados obtidos na depuração, através da comparação da contaminação microbiológica destes bivalves com os bivalves depurados pelos processos convencionais. De forma a avaliar a otimização de cada parâmetro foi estudado o espectro total de contaminação microbiológica e a presença específica de bactérias patogénicas *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp. Através da contagem de UFC do espectro total de contaminação, expressas em UFC/100g, foi possível concluir que de um modo geral as 12h de depuração foram suficientes para redução eficaz de bactérias presentes. Foi unânime às três espécies o valor otimizado para intensidade de radiação UV, $6.000 \mu\text{W.s/cm}^2$, densidade de estabulação, 98 g/L para berbigão e amêijoia e 120 unidades para ostra e a combinação de temperatura 21 °C com salinidade 30 mostrou-se ótima para o berbigão e ostra, sendo que 21 °C com salinidade 35 provou ser a melhor combinação para a amêijoia. Foi possível comprovar o bom funcionamento da depuradora modular com capacidade máxima, 360 L, com equipamento de desinfecção UV de 25 W para ambas as espécies. Estudos desta natureza são essenciais para tornar o processo de depuração o mais eficiente possível, de acordo com as especificidades de cada espécie.

Keywords

Moluscos bivalves, depuração, microbiologia

Abstract

Microbiological contamination of bivalve mollusks is one of the main concerns of alimentary safety of this important source of revenue for Portuguese economy. Bivalves that have been captured or grown in estuaries and lagoons must go through a process of depuration in order to reduce their levels of microbiological contamination, before they can be sold. The main goal of this work is the development of a modular depuration system with advantages over conventional systems, such as: lower implementation costs, higher control of depuration process, greater efficiency in the disinfection of water used for depuration, and easier maintenance. In the first step, three experiments were undertaken so that depuration parameters could be optimized: 1) Optimization of disinfection of the water used for depuration of bivalve mollusks through intensity manipulation ($\mu\text{W.s.cm}^{-2}$) of the applied UV-C radiation; 2) Optimization of bivalve stocking density (kg.L^{-1}) and of the depuration time; 3) Evaluation of the optimal temperature and salinity levels for the depuration of the studied species: edible cockle (*Cerastoderma edule*), pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and pullet carpet shell (*Venerupis corrugata*). After, the maximum operation level of the developed modular depurator was tested, and the results of depuration were evaluated by comparing the microbiological contamination of these bivalves with the bivalves depurated through conventional procedures. In order to evaluate the optimization of each parameter, the total spectrum of microbiological contamination was studied, along with the specific presence of pathogenic bacteria *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Vibrio* spp. Through UFC assemblage of total contamination spectrum, in UFC/100g, it was possible to conclude that overall 12h of depuration are enough to an efficient reduction of bacteria. It was possible to conclude that the optimal value of UV radiation was $6.000 \mu\text{W.s/cm}^2$ for the studied species, and the stocking density, 98 g/L for edible cockle and clams, and 120 units for pacific oyster; the optimal combination of temperature and salinity for depuration of cockles and oysters was 21 °C and 30, respectively, whereas the depuration of clams was more effective under 21 °C, with salinity of 35. It was possible to prove the effectiveness of depuration in the developed systems optimized under maximum capacity of 360 L, with 25 W UV equipment, for both species. Studies of this matter are essencial to transform depuration process into more efficient as possible, in accordance with specifications of each specie.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

Resumo

Abstract

Índice de figuras

Índice de tabelas

1.	INTRODUÇÃO	01
1.1.	A importância dos moluscos bivalves	03
1.1.1.	Berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>)	04
1.1.2.	Ostra do pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)	05
1.1.3.	Amêijoia macha (<i>Venerupis corrugata</i>)	06
1.2.	Contaminação microbiológica dos moluscos bivalves	06
1.2.1.	Espécies associadas a contaminação microbiológica	07
1.3.	Estado da arte e etapas do processo de depuração	10
1.4.	Objetivos	13
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1.	Processo de depuração	15
2.1.1.	Montagem dos sistemas modulares de depuração	15
2.2.	Planificação das experiências	18
2.3.	Ensaio da otimização dos parâmetros de depuração	18
2.3.1.	Parâmetros a analisar	18
2.3.2.	Receção e depuração dos moluscos bivalves	20
2.3.3.	Análise microbiológica	21
2.4.	Ensaio da capacidade máxima de funcionamento da depuradora otimizada	24
2.4.1.	Parâmetros a analisar	24
2.4.2.	Análise microbiológica	25
2.5.	Análise estatística	26
3.	RESULTADOS	27
3.1.	Otimização da intensidade UV	28
3.1.1.	Berbigão (<i>C. edule</i>)	28
3.1.2.	Ostra (<i>C. gigas</i>)	28
3.2.	Otimização da densidade de estabulação	30
3.2.1.	Berbigão (<i>C. edule</i>)	30
3.2.2.	Ostra (<i>C. gigas</i>)	30
3.2.3.	Amêijoia (<i>V. corrugata</i>)	31
3.3.	Otimização da combinação de temperatura e salinidade ótimas	33
3.3.1.	Berbigão (<i>C. edule</i>)	33
3.3.2.	Ostra (<i>C. gigas</i>)	33
3.3.3.	Amêijoia (<i>V. corrugata</i>)	34

3.4.	Capacidade máxima de funcionamento da depuradora otimizada	36
3.4.1.	Berbigão (<i>C. edule</i>)	36
3.4.2.	Ostra (<i>C. gigas</i>)	36
4.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	38
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
6.	ANEXOS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>)	04
Figura 2. Ostra do pacífico (<i>Crassostrea gigas</i>)	05
Figura 3. Amêijoa macha (<i>Venerupis corrugata</i>)	06
Figura 4. Montagem dos sistemas modulares de depuração	15
Figura 5. Processo de colagem de redutor de caudal (PVC) em esterilizador UV 55w	16
Figura 6. Componentes e esquema de um módulo de depuração	17
Figura 7. Equipamento de osmose inversa para purificação de água doce	17
Figura 8. Preparação de quatro meios de cultura de agar	21
Figura 9. Processo de dissecação de moluscos bivalves	22
Figura 10. Amostra após processo de homogeneização	22
Figura 11. Equipamento e processo de filtração da água de depuração	23
Figura 12. Exemplos de tipo de colónias identificativas de cada tipo de meio seletivo: m-FC, SS gar e TCBS agar, respetivamente	25
Figura 13. Efeito de diferentes intensidades UV no processo de depuração do berbigão e da ostra	29
Figura 14. Efeito de diferentes cargas no processo de depuração do berbigão, da ostra e da amêijoa	32
Figura 15. Efeito da combinação de diferentes valores de temperatura e salinidade no processo de depuração do berbigão, da ostra e da amêijoa	35
Figura 16. Efeito de diferentes volumes totais no processo de depuração do berbigão e da ostra	37

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - Classificação de zonas de produção de moluscos bivalves baseada em critérios bacteriológicos (<i>Escherichia coli</i>) (Miranda 2013)	11
Tabela II - Descrição dos valores aplicados para variação da carga e volume dos tanques de depuração	19

1. INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves, ricos em minerais, vitaminas e ácidos gordos polinsaturados, são um importante componente na dieta humana por vários fatores: os ácidos gordos polinsaturados diminuem o risco de formação de coágulos, o que permite uma proteção contra doenças cardiovasculares, bem como redução do colesterol (LDL). Por outro lado, apresentam um conjunto de proteínas essenciais ao correto crescimento e desenvolvimento, entre outras propriedades organoléticas (Nunes et al., 2008).

Em Portugal, a indústria aquícola tem aumentado gradualmente a sua relevância, atingindo em 2014 uma produção de 10.791 toneladas, o equivalente a uma receita de 50.3 milhões de euros. Dentro deste grupo, os moluscos bivalves representaram, ainda no mesmo ano, 45 % da produção total, sendo a amêijoa a espécie mais relevante (2732 toneladas), seguido do mexilhão (1547 toneladas) e ostra (837 toneladas) (INE, 2014).

Relativamente à ostra, a sua produção aumentou 36.6 % em 2014, resultante de um incremento de investimentos na zona Norte do país, em viveiros e espaços antes utilizados para produção de peixe (DGRM, 2014).

Em termos de captura nacional, o berbigão representou o molusco bivalve mais importante (2211 toneladas), seguido da amêijoa (1640 toneladas), mexilhão (132 toneladas) e ostra (89 toneladas) (INE, 2014).

A nível internacional, as vendas da aquicultura de moluscos bivalves representaram 388 toneladas, sendo que o mexilhão representou aproximadamente 62 %, seguido da ostra com aproximadamente 30 % (INE, 2014).

De forma a dar resposta a este aumento de procura de moluscos bivalves, foi necessário criar um processo que permitisse a redução do teor microbiológico de moluscos bivalves para consumo humano, o processo de depuração (Miranda, 2013). De acordo com a legislação, as depuradoras têm de cumprir duas etapas: a validação, onde é realizado um estudo prévio da eficácia do sistema de depuração sob determinados parâmetros; e a verificação, que consiste na realização de análises microbiológicas a agentes patogénicos específicos, nomeadamente a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., antes e após o processo de depuração (*Controlo oficial de moluscos bivalves*, 2014).

1.1. A importância dos moluscos bivalves

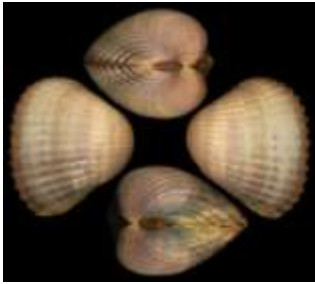
De entre várias definições aceites, o termo molusco bivalve designa o animal de corpo mole protegido por um exosqueleto com forma de uma concha de duas valvas, que se articulam por uma charneira e são mantidas unidas pelos músculos adutores (IPMA, 2016). Lees (2000) acrescenta a esta definição a noção de elevada variabilidade de características e tipo de habitat. Como exemplo desta diversidade de habitat, existem espécies que conseguem adaptar-se a condições de seca, sobrevivendo a longos períodos fora de água através do fechar firme das duas valvas, permitindo a retenção da água do mar em redor da sua componente interna (Lees, 2000). No entanto, ao manterem as valvas fechadas, ficam sujeitos a um período de hipóxia, o que faz com que desenvolvam vias metabólicas anaeróbicas para sobreviver a um período de reduzida disponibilidade de oxigénio (Randall et al., 1997).

Uma vez que se alimentam de pequenas partículas existentes no meio envolvente (como microalgas) (Lees, 2000), os moluscos bivalves bioacumulam bactérias autóctones ou de origem antropogénica sendo, por este motivo, extremamente susceptíveis à contaminação (Rees et al., 2013). Várias espécies de bivalves, como mexilhões e ostras, foram descritas como organismos indicadores ideais, não só pela sua elevada distribuição geográfica, mas também pela sua sensibilidade aos poluentes ambientais (Renault, 2011).

A sua imunidade é suportada por hemócitos presentes na hemolinfa que, para além da eliminação direta dos agentes patogénicos por fagocitose (Feng, 1988), também produzem compostos tais como enzimas lisossomais e moléculas antimicrobianas, que contribuem para a destruição patogénica (Hoffman, 2010). No entanto, existem contaminantes ambientais, como o cádmio e o cobre (Pipe e Coles, 1995), que podem ter um efeito direto na alteração imunológica dos moluscos bivalves (Coles et al., 1994), tornando-os mais suscetíveis a doenças infecciosas (Renault, 2011).

Para a realização deste estudo foram selecionadas três espécies de moluscos bivalves utilizadas como modelos biológicos e com importância económica para a região de produção da Ria de Aveiro: *Cerastoderma edule* (conhecida vulgarmente por berbigão), *Crassostrea gigas* (conhecida vulgarmente como ostra do pacífico) e *Venerupis corrugata* (conhecida vulgarmente por amêijoia macha).

1.1.1. Berbigão (*Cerastoderma edule*)



Espécie nativa do nordeste da costa Atlântica (Paul-Pont et al., 2010), o berbigão (figura 1) *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758), pertence à família dos Cardiidae (WoRMS, 2016).

Figura 1. Berbigão (*Cerastoderma edule*)

In: http://www.idscaro.net/sci/04_med/pictures/fam5/cerastoderma_edule2.jpg

Pode crescer até aos 5,3 cm, tendo uma média de 3,5 cm de comprimento (FAO, 2016). Habita geralmente fundos arenosos e lamacentos de zonas subtidais a poucos centímetros da superfície, encontrando-se amplamente distribuído desde o nordeste da Noruega até o oeste africano (Paul-Pont et al., 2010).

Apresenta uma elevada tolerância a variações dos parâmetros físico-químicos ambientais, tais como granulometria do sedimento e salinidade e, por este motivo, pode ser uma opção para biomonitorização ao longo do gradiente estuarino (Lobo et al., 2010). Para além disso, também pode ser usado como bioindicador de poluição por metais, uma vez que consegue armazenar grandes quantidades de poluentes ambientais devido ao seu elevado poder de filtração (Paul-Pont et al., 2010).

É um suspensívoro (alimenta-se de partículas em suspensão na água), com uma capacidade de filtração de 1 a 3.4 L/h (Dame e Olenin, 2005) e com densidades populacionais elevadas em ambiente marinho e estuarino (Lobo et al., 2010).

Já existem estudos relativos à sua contaminação por *E. coli* (Amoroux e Dominique, 2011) e *Salmonella* (Pereira et al., 2016), bem como estudos que demonstraram uma elevada mortalidade desta espécie quando infetada por *Vibrio tapetis* (Paul-Pont et al., 2010).

1.1.2. Ostra do pacífico (*Crassostrea gigas*)



A ostra do pacífico (figura 2) *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) é originária do Japão e pertence à família dos Ostreidae (WoRMS, 2016).

Figura 2. Ostra do pacífico (*Crassostrea gigas*)

In: https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQ9Xd_cjWsqr10eZyJdD_IkW5Cbv2D0ToU42MuinektOSOGsNG_

Pode crescer até aos 45 cm, mas é mais comum ter apenas 15 cm de comprimento total. Tipicamente sésil, vive no substrato em zonas intertidais ou subtidais até aos 15 m de profundidade, em água salgada e encontra-se distribuída ao longo do atlântico oriental e este do mediterrâneo (FAO, 2016).

A ostra alimenta-se de partículas em suspensão e, por consumir fitoplâncton, tem um papel importante nos ecossistemas estuarinos, ao suprimir a acumulação de matéria orgânica (Officer et al., 1982).

Tal como descrito por Ehrich e Harris (2015), a taxa de filtração varia de acordo com o tamanho das ostras, sendo que ostras de menor tamanho apresentaram uma maior taxa de filtração. No entanto, das três espécies em estudo neste trabalho, é a espécie com maior taxa de filtração (3 a 25 L/h) (Dame e Olenin, 2005).

É também considerada espécie sentinela e bioindicadora devido à sua ampla distribuição, sensibilidade a um largo espectro de poluentes e sedentariedade (Geffard et al., 2002).

Relativamente à contaminação por bactérias patogénicas, De Paola et al., (2010) provou a presença de *E. coli*. A existência de outras bactérias também já foi reportada, como o *Vibrio* spp. (Kueh e Chan, 1985) e *Salmonella* spp. (Corrêa et al., 2007).

1.1.3. Amêijoa macha (*Venerupis corrugata*)



A amêijoa macha (figura 3) *Venerupis corrugata* (denominada anteriormente por *Venerupis pullastra*) (Gmelin, 1791), pertence à família Veneridae (WoRMS, 2016).

Figura 3. Amêijoa macha (*Venerupis corrugata*)

In: <http://www.fao.org/fi/figis/culturespecies/data/assets/images/venerupis/photo-1.jpg>

Pode crescer até a um comprimento máximo de 7,7 cm, mas é mais comum apresentar 4 a 5 cm. Encontra-se geralmente enterrada em substrato arenoso, habita desde a zona de maré baixa ao longo da zona subtidal até 25 m de profundidade e apresenta uma distribuição ao longo do sul do oceano atlântico, África do Sul e Namíbia (FAO, 2016). Apresenta uma capacidade de filtração que varia entre 0.2 e 1.4 L/h (Pandian, 1987).

A amêijoa macha também é muito usada como espécie bioindicadora de contaminação (Saavedra et al., 2004). A sua contaminação por agentes patogénicos já tem sido estudada, como a presença de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp. (Anacleto et al., 2013).

1.2. Contaminação microbiológica dos moluscos bivalves

Em águas costeiras pouco profundas, maioritariamente usadas para produção comercial de moluscos bivalves, a contaminação microbiológica por ser um problema relevante (Butt et al., 2004). Historicamente, a contínua descarga de esgotos tornou-se a principal fonte de contaminação microbiológica em culturas de moluscos bivalves (Campos et al., 2013). Como consequência, a contaminação fecal nestas zonas levou a sérios riscos sanitários, pela ingestão destes organismos contaminados. No entanto, com o progresso no tratamento e controlo das descargas de esgotos, a contaminação dos moluscos bivalves passou a ser consequência do escoamento de terras de produção agrícola, bem como de zonas urbanas (Fong e Lipp, 2005).

Aquando da produção de moluscos bivalves em larga escala, a potencial fonte de contaminação está mais relacionada com escoamentos agrícolas e contaminação fecal de animais selvagens ou de cativeiro (Bakr et al., 2011).

A concentração de agentes patogénicos encontrada numa determinada zona de produção vai depender de vários fatores como o tipo de fonte de contaminação: podem-se encontrar microrganismos naturalmente presentes na zona de produção, como algumas espécies de *víbrio* (Thompson et al., 2004); e bactérias e parasitas de origem fecal, cuja presença se associa a focos de contaminação antropogénica, sendo por isso usadas como indicadores de contaminação (Lee e Younger, 2002). Um outro grupo de fatores a ter em conta são as condições geográficas, meteorológicas e hidrológicas que, no seu conjunto, podem criar condições favoráveis à sua propagação e desenvolvimento (Alberts et al., 2014). Ainda assim, o local onde os moluscos bivalves se encontram, na coluna de água ou no fundo oceânico, também pode determinar o grau de contaminação presente (Lee e Younger, 2002). Fortemente influenciada pelo tipo e quantidade de minerais argilosos e matéria orgânica presente, a presença de bactérias tende a ser maior em sedimentos de textura fina (Hassard et al., 2016). Grande parte dos estudos de quantificação da comunidade bacteriana e viral foca-se na coluna de água, no entanto, os valores são frequentemente mais elevados no interior do sedimento (Perkins et al., 2014). Esta associação com o sedimento pode ser explicada pelo aumento da sua sobrevivência por ligação à superfície das partículas de sedimento inerente à matriz de biofilme presente (Pachepsky e Shelton, 2011). Existem poucos estudos que analisam a diversidade bacteriana tanto na coluna de água como no sedimento marinho (Zinger et al., 2011; Hamdan et al., 2013). No entanto, já existem estudos que comprovam que a riqueza taxonómica bacteriana é de um modo geral maior na coluna de água do que no sedimento (Walsh et al., 2016)

1.2.1. Espécies associadas a contaminação microbiológica

Quando considerados como alimentos, os moluscos bivalves são consumidos normalmente crus ou apenas levemente cozinhados. Este processo tradicional pode não ser suficiente para inativação de micróbios ou toxinas (Butt et al., 2004) e por esta razão o

seu consumo pode constituir um potencial risco para a saúde humana (Murchie et al., 2005). A alteração da qualidade dos moluscos bivalves pode ser ameaçada por vários tipos de contaminação. Tanto podemos falar de contaminação por oligoelementos como metais e radionuclídeos (Breitwieser et al., 2016), como por poluentes orgânicos como pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). Para além disso, os moluscos bivalves são muito susceptíveis a contaminação microbiológica causada por espécies patogénicas - organismos capazes de produzir doenças infecciosas aos seus hospedeiros, quando encontram condições favoráveis à sua propagação e desenvolvimento (Alberts et al., 2014). No entanto, existem espécies de bactérias que são ingeridas como alimento (baterioplâncton) ou naturalmente presentes no trato digestivo dos moluscos bivalves (Alberts et al., 2014), logo falamos de contaminação bacteriana para o Homem provocada pela ingestão de moluscos bivalves contaminados por espécies capazes de produzir doenças no hospedeiro final, o Homem. Esta patogenicidade em moluscos bivalves pode ser tanto bacteriana (Oliveira et al., 2011) como viral (Suffredini et al., 2014) ou protista (Butt et al., 2004). Para além da contaminação local, estes organismos podem ficar contaminados durante o manuseamento, processamento ou preparação (Iwamoto et al., 2010).

A *E. coli* é uma espécie bacteriana naturalmente presente no intestino de animais de sangue quente, usada como indicadora de contaminação fecal (Ishii e Sadowsky, 2008). Embora a maioria das estirpes de *E. coli* sejam inofensivas, algumas estirpes podem causar doenças no ser humano, como intoxicações alimentares ou diarreia (Ishii e Sadowsky, 2008). A sua presença em moluscos bivalves (carne e líquido intra-valvar) sugere a presença de bactérias de origem fecal que, de acordo com anexo I do Regulamento (CR) Nº 1441/2007 de 5 de Dezembro” indica que o produto não cumpre os requisitos para consumo humano (230 NMP/100 g de carne e de líquido intra-valvar). A técnica de tubos múltiplos permite a quantificação do “número mais provável” (NMP) de *E. coli* e é dividida em duas fases: numa primeira fase faz-se a homogeneização de cada um de 5 tubos de ensaio com meio de cultura apropriado (caldo lauril triptose), um tubo invertido no fundo para coleta de gás (tubo de Durhan) e alíquotas/diluições da amostra a analisar. Numa segunda fase, a fase confirmativa, efetua-se um repique dos tubos com

crescimento positivo para tubos iguais mas com caldo verde brilhante, de forma a conseguir confirmar o crescimento identificado pela produção de gás nos tubos de Durhan. De acordo com o número de tubos positivos em cada uma das diluições, determina-se o número mais provável (NMP) a partir de tabelas estatísticas (Bettega et al., 2006).

Durante o processo de depuração existem taxas de eliminação diferentes para os contaminantes presentes nos moluscos bivalves, e para a *E. coli* esta eliminação é mais rápida em comparação com outras espécies de bactérias ou vírus (Lee e Younger, 2002). Ao avaliarmos a eficácia do processo pela presença desta bactéria, podemos correr o risco de considerar o produto como alimento seguro, mesmo com a presença de outras bactérias ou vírus potencialmente patogénicos para o Homem, o que torna questionável o uso da *E. coli* como modo de avaliação da eficácia do processo de depuração em moluscos bivalves (Crocì et al., 2002).

A presença de *Salmonella* spp. é também muito comum em peixes e moluscos bivalves contaminados, representando maior risco de infeção no segundo caso (Iwamoto et al., 2010).

Salmonella spp. encontra-se maioritariamente associada a casos de gastroenterite aguda, apresentando sintomas como diarreia, dores abdominais e febre. Pode também manifestar-se através de outros casos clínicos, tais como febre entérica, infeções no trato urinário ou infeções locais severas (Iwamoto et al., 2010).

A avaliação da presença de *Salmonella* em moluscos bivalves é feita de acordo com os critérios de segurança da União Europeia, como descrito no regulamento CE nº 1831/2003 de 5 de Dezembro, em que se deve validar para consumo humano a ausência de *Salmonella* spp. em 25g de molusco bivalve de um mesmo lote.

Vibrio spp. são bactérias gram-negativas autóctones a ambientes aquáticos, incluindo estuários e águas costeiras por todo o mundo (Gómez-León et al., 2005). Algumas espécies da família *Vibrionaceae* são microrganismos patogénicos comumente presentes em organismos marinhos, em particular peixes, corais e moluscos bivalves, responsáveis por desencadarem infeções nos seus hospedeiros, incluindo o ser humano (Prado et al., 2005). Em específico no caso humano, uma vez que esta bactéria apresenta

a capacidade de sobreviver em ambiente aquático mesmo em ausência de componente orgânica, o seu modo de infecção torna-se bastante polivalente (Asplund, 2013), como infecções humanas entéricas, contaminação de feridas e septicémia (Thompson et al., 2004).

Várias espécies de *Vibrio* estão relacionadas com o aumento do número de intoxicações alimentares pelo consumo de moluscos bivalves e o desenvolvimento de doenças que podem até causar a morte (Barile et al., 2009).

De momento ainda não existe legislação relativa ao controlo do teor de *Vibrio* spp. em amostras de moluscos bivalves para consumo humano.

1.3. Estado da arte e etapas do processo de depuração

Quando os moluscos bivalves não podem ser considerados para consumo humano têm de passar pelo processo de depuração (Miranda, 2013). Este processo tem vindo a ser praticado desde os anos 80, inicialmente desenvolvido como método de prevenção da febre tifóide e outras doenças atribuídas ao consumo de moluscos bivalves contaminados (Rees et al., 2013).

De acordo com o despacho nº 15264/2013 da 2ª série do Diário da República de 22 de novembro de 2013, existe uma distinção das zonas de produção de moluscos bivalves em cinco classes, baseada em critérios bacteriológicos, mais especificamente ao nível de contaminação por *E. coli* (Miranda, 2013):

- Classe A: Os bivalves podem ser apanhados e comercializados para consumo humano direto.
- Classe B: Os bivalves podem ser apanhados e destinados a depuração, transposição ou transformação em unidade industrial.
- Classe C: Os bivalves podem ser apanhados e destinados a transposição prolongada ou transformação em unidade industrial.
- Classe “Proibido”: Interdita a captura de moluscos bivalves.
- Não classificada: Interdita a captura de moluscos bivalves por insuficiência de dados

As classes acima indicadas têm por base as diretivas do sistema HACCP descritas no anexo I do Regulamento (CR) Nº 1441/2007 de 5 de Dezembro. Na tabela I temos sumariadas estas diretivas.

Tabela I - Classificação de zonas de produção de moluscos bivalves baseada em critérios bacteriológicos (*Escherichia coli*) (adaptado de Miranda 2013)

Classe	Teor de <i>Escherichia coli</i> (NMP/100g)*	Observações
A	$x < 230$	_____
B	$230 > x \leq 4600$	Pelo menos em 90 % das amostras e nenhuma exceder 46000
C	$4600 > x \leq 46000$	_____
Proibido	$x < 46000$	_____

* de carne e líquido intravalvar

No processo de depuração, os moluscos bivalves são colocados em tanques construídos para este propósito, nos quais continuam o seu processo natural de filtração em água salgada limpa (Lee e Younger, 2002).

Os sistemas de depuração podem ser classificados como depuração de fluxo contínuo ou depuração por recirculação. Embora a depuração por fluxo contínuo exija maior quantidade de água (sistema aberto), o sistema recirculado necessita de tratamentos de desinfecção da água para evitar contaminação microbiológica (Barile et al., 2009).

Esta desinfecção pode ser química, através do uso de cloro ou ozono. Uma vez que o ozono atua contra as bactérias e vírus (por ação combinada de oxidação proteica, alteração da estrutura molecular e inibição enzimática), é considerado um método mais eficaz do que o uso de cloro (Barile et al., 2009).

A desinfecção também pode ser física, mediante o uso de radiação UV, que promove a inativação de vírus (20-30 mW.s/cm²), bactérias entéricas e coliformes (30-40 mW.s/cm²), e esporos bacterianos e protozoários (40-60 mW.s/cm²). Este método de desinfecção apresenta várias vantagens, com a inativação de agentes patogénicos sem a produção de toxinas, eficácia em períodos reduzidos de depuração e preservação das características organolépticas dos moluscos bivalves (Barile et al., 2009). No entanto, a sua eficiência pode ser afetada pela turbidez da água e consequente deposição de matéria

orgânica na lâmpada, reduzindo a desinfecção da água (Oustromov, 2005; Barile et al., 2009).

Mas a eficiência do processo de depuração pode alterar-se de acordo com algumas variáveis, tais como turbidez da água, pH, salinidade, temperatura e densidade de moluscos bivalves. Tal como concluiu Love et al. (2010) é de prever que as primeiras duas variáveis (turbidez e pH) não alterem a eficiência do processo de depuração. No entanto, a temperatura e salinidade são dois parâmetros importantes a ter em consideração no processo de depuração (Oliveira et al., 2011).

Relativamente à temperatura, águas mais quentes mas com temperaturas dentro dos limites fisiológicos de cada espécie, promovem um aumento da taxa metabólica dos moluscos bivalves, como a digestão e a atividade enzimática (Loosanoff, 1958), tendo todos estes fatores um papel relevante na redução microbiana (Brock et al., 1986). A salinidade é também um parâmetro de grande importância para o processo de depuração, tendo em conta a reduzida capacidade de adaptação dos moluscos bivalves à sua variação (Love et al., 2010).

De acordo com Romero e Moreira (1981), os efeitos biológicos de temperatura e salinidade estão correlacionados de várias formas, podendo interagir e produzir um efeito sinérgico nos organismos aquáticos (Albuquerque et al., 2012).

Está definido de um modo geral na legislação Portuguesa que o processo de depuração é de máxima importância para que os moluscos bivalves vivos, provenientes de zonas de classe B, reduzam a sua contaminação microbiológica até valores considerados seguros e admissíveis (*Controlo oficial de moluscos bivalves, 2014*). Para tal, as depuradoras têm de cumprir duas etapas: a validação, definida como “o estudo prévio com evidências de que o sistema é eficaz sobre determinados parâmetros, os quais há que respeitar e verificar”; e a verificação, definida como “a habitual realização de análises microbiológicas”. Para respeito dos critérios de segurança estabelecidos no Regulamento nº 2073/2005, esta análise microbiológica deve fazer-se à presença de *Salmonella* e quantidade de *E. coli*, preferencialmente ao mesmo lote, antes e após o processo de depuração, de modo a demonstrar se o método de depuração usado é eficaz (*Controlo oficial de moluscos bivalves, 2014*).

Relativamente à carga de moluscos bivalves a depurar, já existem valores de referência em Portugal, que corresponde a 150 g/L para a amêijoia (Anacleto et al., 2013). Estudos desta natureza são essenciais para padronizar valores ótimos de depuração para cada espécie e desta forma maximizar a eficácia de todos os centros de depuração.

A legislação define que: "(...) será inaceitável que haja aprovações de novas depuradoras sem prévio estudo com evidências de que o sistema é eficaz sobre determinados parâmetros, os quais há que respeitar, verificar e que muitas vezes nem sequer são conhecidos (por exemplo, fluxo/quantidade de água, carga máxima de bivalves no tanque, alturas das camadas, oxigénio, salinidade e temperatura da água, o tratamento dado à água com suas variáveis e o tempo mínimo do processo)" (*Controlo oficial de moluscos bivalves, 2014*).

1.4. Objetivos

Este trabalho realizado no âmbito do projeto Depurplus: "Otimização do processo de depuração de moluscos bivalves", tem como objetivo o desenvolvimento de sistemas modulares de depuração, que apresentem vantagens em relação aos sistemas convencionais. Serão utilizadas como modelos biológicos três espécies com importância económica para a região delimitada pela zona de produção da ria de Aveiro: berbigão (*Cerastoderma edule*), ostra (*Crassostrea gigas*) e amêijoia macha (*Venerupis corrugata*).

Numa primeira abordagem, de modo a otimizar os parâmetros de depuração, serão realizadas três experiências: 1) Otimização da desinfecção da água de depuração dos moluscos bivalves pela manipulação da intensidade ($\mu\text{W.s.cm}^{-2}$) da radiação UV-C aplicada e da regulação do caudal da água no sistema UV; 2) Otimização da carga biológica a depurar (kg.L^{-1}) e do tempo de depuração; 3) Avaliação da temperatura e salinidade ótimas para depuração dos moluscos bivalves estudados.

Posteriormente, será testada a capacidade máxima de funcionamento da depuradora modular desenvolvida, avaliando-se os resultados obtidos na depuração, através da comparação da contaminação microbiológica destes bivalves com os bivalves depurados pelos processos convencionais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Processo de depuração

Numa fase inicial deste trabalho experimental, procedeu-se à montagem de um conjunto de sistemas modulares de depuração, onde foi realizada a componente experimental de depuração.

2.1.1. Montagem dos sistemas modulares de depuração

Montaram-se 12 tanques de 250 L de capacidade, em que cada um funcionou como módulo experimental de depuração (figura 4).

Cada um dos módulos foi equipado com um sistema de arejamento (tubo de PVC perfurado), para manutenção dos níveis de oxigénio perto dos valores de saturação durante o processo de depuração; uma bomba de recirculação EHEIM Universal-pump 1262, com um rendimento de 3400 L/h, para impulsão da água através do sistema de filtração; uma torneira em PVC, para controlo do caudal entre sistema de arejamento e filtro UV, um refrigerador (modelo Hailea HC 300-A (1/4 HP)), para controlo da temperatura da água, um escumador de proteínas para remoção da matéria orgânica da água e um aquecedor com termostato (apenas incorporado nos módulos de depuração para temperaturas mais elevadas – 21 °C).

Para 9 dos 12 módulos de depuração foi utilizado um sistema de filtração UV 25 W (modelo Vecton 600), para o estudo do efeito da intensidade baixa e média de radiação UV-C; nos restantes 3 módulos foi incorporado um sistema de filtração UV 55 W (modelo P1), para o estudo do efeito da intensidade elevada de radiação UV-C.



Figura 4. Montagem dos sistemas modulares de depuração. 12 módulos de depuração (à esquerda) e destaque para um módulo (à direita), ambos em funcionamento.








Para a montagem de todo o circuito e conexões, usaram-se tubos e peças em PVC (*Polyvinyl chloride* – nome IUPAC policloroeteno), bem como mangueiras de diferentes diâmetros consoante as especificidades de cada equipamento. Os componentes de PVC foram unidos com cola de PVC ou fita Teflon (figura 5).



Figura 5. Processo de colagem de redutor de caudal (PVC) em esterilizador UV 55w

O esquema representado na figura 6 mostra o circuito da água ao longo de todo o módulo de depuração, começando pela impulsão da água do tanque de depuração pela bomba de recirculação (X) para o sistema de filtração UV, em que a torneira (V) permite o controlo do caudal que passa para o filtro UV e para o sistema de arejamento (tubo em PVC perfurado). Após esterilização UV pela passagem do filtro (UV), a água é direcionada para o refrigerador (Ref.), através do qual retorna ao tanque de depuração. Em paralelo a este processo, o escumador de proteínas (E) com bomba de recirculação integrada permite a passagem contínua de água do tanque de depuração. O aquecedor com termostato (T) apenas se encontra associado aos sistemas de depuração com temperatura mais elevada (21 °C).

Concluída a montagem de todos os módulos de depuração, os mesmos foram abastecidos com água corrente para permitir identificação e reparação de fugas de água, bem como a confirmação do funcionamento correto de todos os equipamentos.

Legenda			
	 Bomba de recirculação	 Torneira	 Sistema de filtração
 Refrigerador	 Escumador de proteínas	 Aquecedor com termostato	

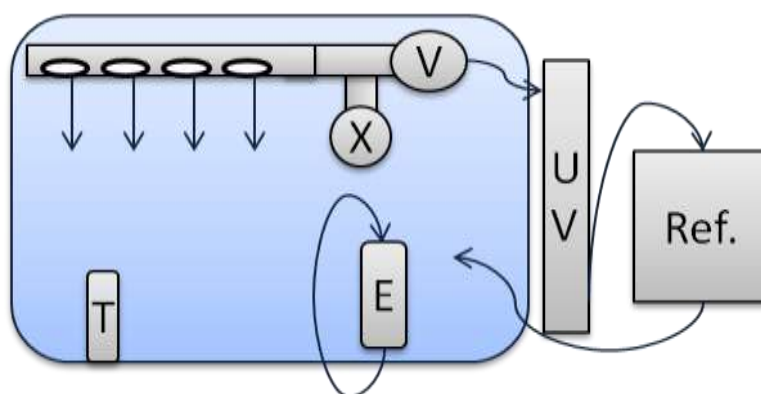


Figura 6. Componentes e esquema de um módulo de depuração.

Através da legenda acima indicada é possível observar cada componente instalado nos módulo de depuração e circuito da água ao longo do processo.

Para a realização de todas as experiências, optou-se pelo uso de água salgada sintética, resultante da mistura de água doce purificada por um sistema de osmose inversa (figura 7) e sal sintético adequado para manutenção de invertebrados marinhos (“Red Sea Coral Pro Salt”). A água salgada sintética foi produzida em dois depósitos de 1000 L e posteriormente distribuída pelos módulos de depuração (sistema recirculado).



Figura 7. Equipamento de osmose inversa para purificação de água doce

2.2. Planificação das experiências

Numa primeira fase foram realizadas três experiências para a otimização de parâmetros de depuração: 1) otimização da desinfecção da água de depuração dos moluscos bivalves pela manipulação da intensidade de radiação UV-C aplicada ($\mu\text{W.s.cm}^{-2}$); 2) Otimização do valor da densidade de estabulação (kg/L) e do tempo de depuração; 3) Avaliação da temperatura e salinidade ótimas para depuração dos moluscos bivalves em estudo.

A seleção do valor dos parâmetros físico-químicos da água para cada experiência teve em consideração os valores utilizados no processo de depuração convencional.

Posteriormente testou-se a capacidade máxima de funcionamento da depuradora modular desenvolvida e avaliaram-se os resultados obtidos na depuração, através da comparação da contaminação microbiológica destes bivalves com os bivalves comercializados, provenientes de zonas de classe A e B.

2.3. Ensaio da otimização dos parâmetros de depuração

2.3.1. Parâmetros a analisar

a) Intensidade UV

Numa primeira fase realizaram-se quatro ensaios em triplicado para cada espécie (berbigão e ostra), com a aplicação de quatro intensidades de radiação UV-C diferentes, pela aplicação de lâmpadas com diferentes potências (25 W e 55 W), e regulação do caudal da água através do equipamento UV:

UV1 - radiação UV-C de baixa intensidade: 25 W + 200 L/h – $3.000 \mu\text{W.s/cm}^2$

UV2 - radiação UV-C de intensidade intermédia: 25 W + 400 L/h – $6.000 \mu\text{W.s/cm}^2$

UV3 - radiação UV-C de elevada intensidade: 25 W + 800 L/h – $9.000 \mu\text{W.s/cm}^2$

UV4 - radiação UV-C de intensidade máxima: 55 W + 800 L/h – $12.000 \mu\text{W.s/cm}^2$

Definiu-se como densidade de estabulação 13g.L^{-1} para o berbigão, e 30 indivíduos. m^{-2} no caso das ostras.

O ensaio decorreu à temperatura 15 °C, e salinidade 35 (valores medidos no momento de coleta dos moluscos bivalves).

Recolheram-se amostras antes da depuração, 12h e 24h após o início da depuração.

b) Densidade de estabulação

Avaliou-se a densidade de estabulação ideal de bivalves a depurar, realizando-se quatro ensaios para cada espécie, através da aplicação de quatro níveis de carga biológica (tabela II).

Nesta fase definiu-se o valor otimizado para a intensidade de radiação UV-C (6.000 $\mu\text{W.s/cm}^2$), e manteve-se os valores anteriormente definidos para a temperatura e salinidade.

Para as experiências com a espécie de berbigão, *C. edule*, foram recolhidas amostras antes da depuração, 12h, 24h e 48h após o início da depuração. Para as experiências com a espécie de ostra, *C. gigas*, foram recolhidas amostras antes da depuração, 12h e 24h após o início da depuração. No caso da espécie de amêijoia, *V. corrugata*, foram recolhidas amostras antes da depuração e 12h após o início da depuração.

Tabela II - Descrição dos valores aplicados para variação da carga e volume dos tanques de depuração

Espécies	Carga			
Berbigão e amêijoia	24 g/L	49 g/L	73 g/L	98 g/L
Ostra	30 unidades	60 unidades	90 unidades	120 unidades

c) Temperatura e salinidade

Numa terceira fase, testou-se uma combinação de temperatura e salinidade ótimas da água a utilizar na depuração. Definiram-se 9 tratamentos resultantes da combinação entre três valores de temperatura (15 °C, 18 °C e 21 °C) e três valores de salinidade (25, 30 e 35).

Para os restantes parâmetros, utilizou-se os valores otimizados de intensidade de radiação UV-C ($6.000 \mu\text{W.s/cm}^2$) e densidade de estabulação (98 g/L; 120 unidades para a ostra).

Para as experiências com a espécie de berbigão e ostra foram recolhidas amostras antes da depuração, 12h e 24h após o início da depuração. No caso da espécie de amêijoia, *V. corrugata*, foram recolhidas amostras antes da depuração e 12h após o início da depuração.

2.3.2. Receção e depuração dos moluscos bivalves

Os processos de depuração dos moluscos bivalves foram conduzidos após instalação dos módulos de depuração.

Fez-se uma avaliação físico-química da água dos diferentes módulos de depuração, para confirmação das condições inicialmente estabelecidas, através da medição dos parâmetros temperatura, salinidade, pH e oxigénio dissolvido. Fez-se também a recolha de água, para posterior análise microbiológica, de todos os módulos de depuração, com recurso a um frasco de colheita previamente autoclavado.

Os moluscos bivalves foram recolhidos de zonas B (Ria de Aveiro e Ria Formosa). Como controlo do ensaio de depuração foi incluído o tempo 0h, que corresponde a indivíduos sem depuração. Para esta análise, foi retirada uma amostra de moluscos bivalves antes dos restantes serem colocados nos tanques. Esta amostra foi mantida a 4 °C até ao seu processamento. Após a distribuição aleatória dos restantes moluscos bivalves nos tanques de depuração, deu-se início ao processo de depuração.

Para todas as experiências foram definidas 3 réplicas para cada amostra, sendo que para cada réplica foram escolhidos aleatoriamente 3 indivíduos, no caso das espécies de berbigão e amêijoia, e 1 indivíduo no caso da ostra.

Decorridos os tempos de depuração estabelecidos anteriormente (12h, 24h e 48h), foram recolhidos aleatoriamente 9 moluscos bivalves por cada módulo de depuração. Terminada a amostragem, os moluscos bivalves e água foram acondicionados em malas térmicas e transportadas imediatamente para o laboratório de microbiologia.

Entre experiências a água dos módulos de depuração foi descartada com prévia desinfecção por ozono e os módulos de depuração foram limpos fazendo circular água doce no interior dos equipamentos durante 48 horas.

2.3.3. Análise microbiológica

A avaliação dos processos de depuração em estudo foi efetuada usando o método de sementeira à superfície num meio geral para bactérias totais viáveis - PCA (*plate count agar*). De forma a aproximar as condições de cultivo às características originais das amostras, também se usou PCA agar enriquecido com 20 % NaCl. Foram também usados meios seletivos para pesquisa de *E. coli* (m-FC agar), *Salmonella* spp. (SS agar) e *Vibrio* spp. (TCBS agar).

a) Preparação de meios de agar

A preparação dos meios de cultura foi efetuada de acordo com as instruções do fabricante. Após autoclavagem do PCA agar e aquecimento para dissolução dos restantes três meios, figura 8, foram plaqueados e armazenados a 8 °C até à sua utilização.



Figura 8. Preparação de quatro meios de cultura de agar.
Da esquerda para a direita: PCA; m-FC agar (coloração azulada); SS agar (coloração avermelhada); TCBS agar (coloração esverdeada).

b) Análise microbiológica das amostras

Os moluscos bivalves foram previamente limpos de areias com água estéril e dissecados em condições de assepsia. Toda a componente edível (carne e líquido intravalvar) foi amostrada (figura 9).



Figura 9. Processo de dissecação de moluscos bivalves.

Após a recolha do material biológico de cada réplica, procedeu-se à esterilização da bancada e material de dissecação. Repetiu-se este processo ao longo de três réplicas por amostra.

As amostras foram colocadas em tubos de 50 ml, mantidas em gelo até à sua homogeneização por ação mecânica com o auxílio de um berbequim adaptado com um pilão (figura 10). No final do processo de homogeneização foi registado o peso de cada réplica.



Figura 10. Amostra após processo de homogeneização.

Foram preparadas diluições decimais das amostras em soro fisiológico (NaCl 0.9%). Alíquotas de 100 µl destas diluições foram semeadas nas placas de petri com meio de cultura (PCA para microrganismos totais ou viáveis, m-FC agar para *E. coli*, SS agar para *Salmonella* spp., e TCBS agar para *Vibrio* spp.).

Após a inoculação das várias diluições nos diferentes meios de cultura, as placas foram incubadas seguindo as especificações de cada meio de cultura:

- PCA, SS agar e TCBS agar – incubação a 35 °C
- mFC agar – incubação a 44 °C

Foi realizado um controlo da água de depuração, através da amostra de água previamente recolhida. Para isso foi filtrada uma amostra de água de 100 ml em triplicado, através do equipamento de filtração a vácuo ilustrado na figura 11. Alíquotas da amostra de água (100 µl) também foram semeadas em placas de PCA e m-FC (3 por meio), posteriormente incubadas de acordo com as especificações do meio.

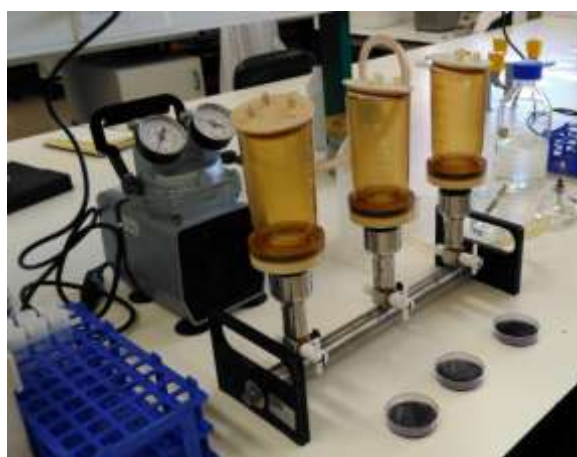


Figura 11. Equipamento e processo de filtração da água de depuração.

Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se à contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFC – medida que permite estimar o número de bactérias ou fungos viáveis numa dada amostra) nas placas inoculadas.

2.4. Ensaio da capacidade máxima de funcionamento da depuradora otimizada

2.4.1. Parâmetros a analisar

Numa segunda fase, foi estudada a resposta dos equipamentos de depuração em condições de tanque de depuração com 50 % de volume de água (o equivalente a 180 L), e tanque de depuração com 100 % de volume de água (o equivalente a 180 L).

Para tal, foram definidos quatro tratamentos, fazendo variar o volume total com os dois equipamentos de filtração UV, de 25 W e 55 W:

V1: 90 L; 25 W ($6.000 \mu\text{W.s/cm}^2$)

V2: 180 L; 25 W ($6.000 \mu\text{W.s/cm}^2$)

V3: 90 L; 55 W ($9.000 \mu\text{W.s/cm}^2$)

V4: 180 L; 55 W ($9.000 \mu\text{W.s/cm}^2$)

Foram utilizados os valores de intensidade de radiação UV-C, densidade de estabulação, temperatura e salinidade otimizados no primeiro ensaio.

Após otimização do processo de depuração para as três espécies em estudo, procedeu-se ao estudo dos moluscos bivalves presentes no mercado e provenientes de zonas de classe A e B.

Para além das espécies estudadas anteriormente, também foram seleccionadas outras espécies de moluscos bivalves, perfazendo um total de 12 amostras distintas (ver anexo II). De forma a abranger o maior número de condições possível e assim obter uma boa amostra de comparação com os resultados obtidos nas experiências, foram seleccionados moluscos bivalves com as seguintes características:

- Locais de comércio distintos
- Depuradoras diferentes
- Diferentes zonas de captura
- Diferentes datas de embalamento.

2.4.2. Análise microbiológica

Para a pesquisa de microrganismos específicos, utilizou-se m-FC agar, SS agar e TCBS agar, para identificação de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp., respetivamente.

Com observação cuidada das placas de meio seletivo, foram selecionadas e numeradas colónias com o aspeto semelhante ao esperado para o tipo de microrganismo, procedendo-se a uma repicagem para confirmação:

SS agar – repicagem para o mesmo meio

TCBS agar – repicagem para agar de canamicina-esculina-azida

m-FC agar – não necessita de repicagem

A figura 12 mostra o aspeto esperado das colónias dos microrganismos pesquisados para cada um destes três tipos de meio.



Figura 12. Exemplos de tipo de colónias identificativas de cada tipo de meio seletivo: m-FC, SS gar e TCBS agar, respetivamente

In (da esquerda para a direita):

http://www.merckmillipore.com/PT/en/product/M-FC-agar,MDA_CHEM-111278?ReferrerURL=https://www.google.pt/

<http://itanimal.ipdisk.co.kr:8642/lectures/201601/MicrobiologyLab/ss.pdf>

http://www.merckmillipore.com/PT/en/product/TCBS-agar,MDA_CHEM-110263?ReferrerURL=https://www.google.pt/

2.5. Análise estatística

A análise estatística foi desenvolvida com recurso ao software Statistica versão 8.0 (StatSoft Inc.). Os níveis de significância da concentração de unidades formadoras de colónias (UFC), para os tratamentos de otimização da intensidade de radiação UV-C e densidade de estabulação e tempo de depuração, foram testados usando “one-way ANOVA”. Para a otimização da combinação de temperatura e salinidade, foram testados os níveis de significância da concentração de UFC usando “two-way ANOVA”.

De forma a garantir a validação dos testes para os dados recolhidos, a distribuição normal dos dados e homogeneidade de variâncias foi previamente confirmada com recurso ao teste W de Shapiro-Wilk e ao teste de Levene. Foram considerados como estatisticamente significativos os resultados com valor de $p < 0.05$.

Uma tabela que sumaria os resultados das ANOVAs (graus de liberdade, valores de F e de P) encontra-se no anexo II.

3. RESULTADOS

Não foi possível obter nenhum resultado de confirmação da presença de bactérias específicas, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp. nas análises da água de depuração e controlo de moluscos bivalves de mercado.

3.1. Otimização da intensidade UV

3.1.1. Berbigão (*C. edule*)

Pelos resultados obtidos para o meio de cultivo PCA (figura 13, letra A), observou-se que para os tratamentos UV1, UV3 e UV4, correspondentes a 3.000 $\mu\text{W.s/cm}^2$, 9.000 $\mu\text{W.s/cm}^2$ e 12.000 $\mu\text{W.s/cm}^2$ respetivamente, apenas existiu um decréscimo significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e após 12h de depuração ($p < 0.05$). No caso do tratamento UV2, correspondente a 6.000 $\mu\text{W.s/cm}^2$, existiu uma redução significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e após 12h de depuração ($p < 0.05$) e um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e 24h de depuração ($p < 0.05$).

Relativamente aos resultados obtidos para o meio de cultivo PCA 20 % (figura 13, letra B), registou-se para o tratamento UV1 um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e após 12h de depuração ($p < 0.05$), seguido de uma diminuição significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$). Para o tratamento UV2 apenas existiu um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$). Para os restantes tratamentos UV3 e UV4 não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ao longo do processo de depuração ($p > 0.05$).

3.1.2. Ostra (*C. gigas*)

Pelos resultados obtidos através do meio de cultivo PCA (figura 13, letra C), observou-se que para o tratamento UV1 existiu um decréscimo estatisticamente significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h ($p < 0.05$), seguido de um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e 24h de depuração ($p < 0.05$). No caso do tratamento UV2 apenas se registou uma diminuição significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$). Para ambos os tratamentos

UV3 e UV4, existiu apenas uma diminuição significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$).

Relativamente aos resultados obtidos através do meio de cultivo PCA 20 % (figura 13, letra D), registou-se para o tratamento UV1 um aumento estatisticamente significativo entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$) seguido de uma redução significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$). Para os tratamentos UV2 e UV4 não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$). No caso do tratamento UV3 apenas se registou um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$).

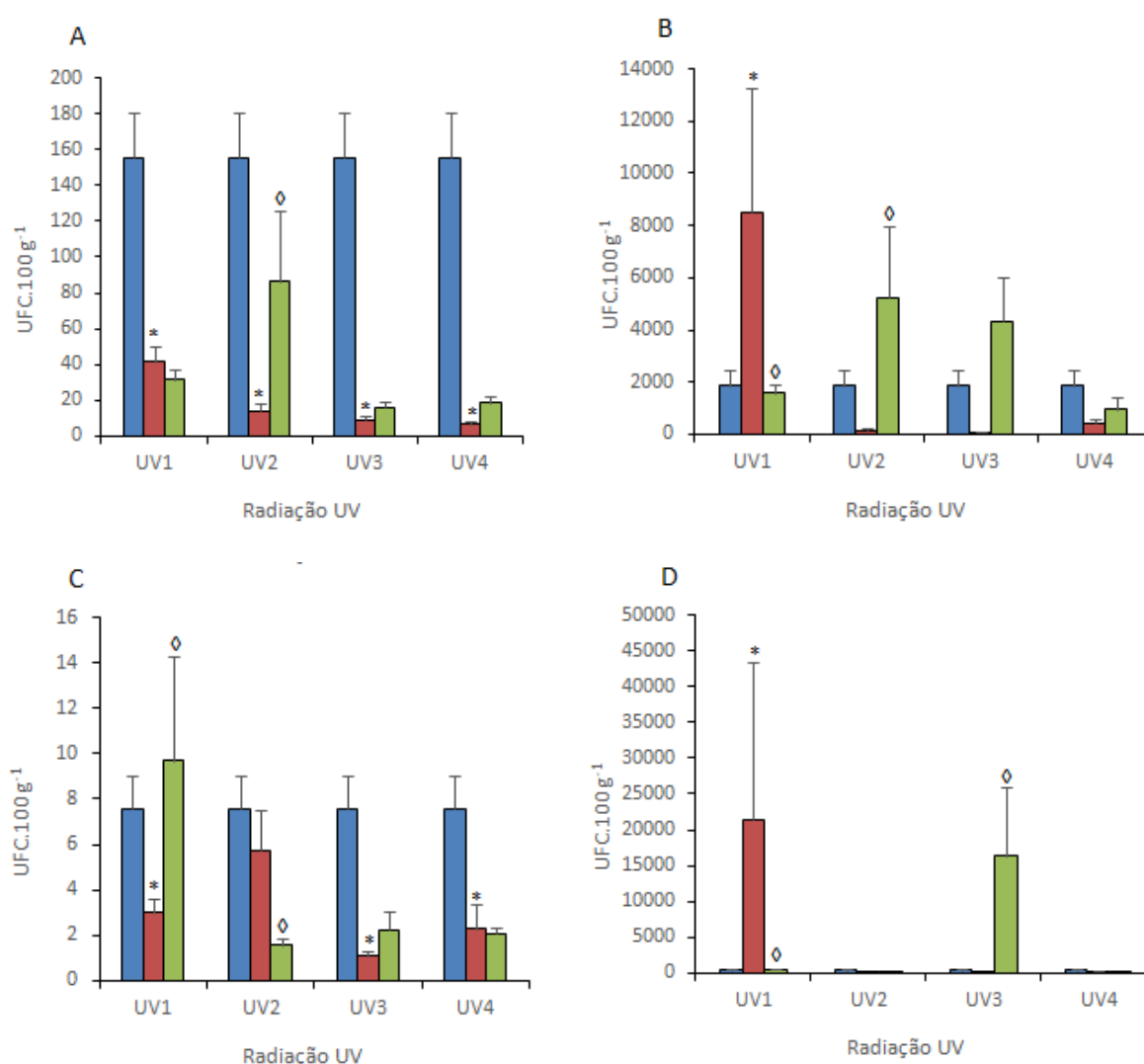


Figura 13. Efeito de diferentes intensidades UV no processo de depuração do berbigão e da ostra. As letras A e B correspondem às contagens de UFC para o berbigão em meio PCA e PCA 20%, respetivamente. As letras C e D correspondem às contagens de UFC para a ostra em meio PCA e PCA 20%, respetivamente. As três colunas correspondem a diferentes tempos de depuração: 0h (azul), 12h (vermelho) e 24h (verde). Os símbolos * e \diamond definem diferenças estatisticamente significativas (D.S.) entre tempo de depuração de um mesmo tratamento (* D.S. entre as 0h e as 12h; \diamond D.S. entre as 12h e as 24h).

3.2. Otimização da densidade de estabulação

3.2.1. Berbigão (*C. edule*)

Relativamente aos resultados obtidos para o meio de cultivo PCA (figura 14, letra A), observou-se que para os tratamentos C1 e C3, correspondentes a 24 g/L e 73 g/L respetivamente, apenas existiu um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$).

No caso dos tratamentos C2 e C4, correspondentes a 49 g/L e 98 g/L respetivamente, não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$).

Nos resultados obtidos para o meio de cultivo PCA 20 % (figura 14, letra B), apenas se registou para o tratamento C2 um aumento estatisticamente significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 24h e as 48h de depuração ($p < 0.05$). Para os tratamentos C1, C3 e C4 não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$).

3.2.2. Ostra (*C. gigas*)

Relativamente aos resultados obtidos para o meio de cultivo PCA (figura 14, letra C) para o tratamento C3, apenas se registou um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$). Relativamente aos tratamentos C1, C2 e C4 não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$).

Para os resultados obtidos para o meio de cultivo PCA 20 % (figura 14, letra D) para o tratamento C3, registou-se um aumento estatisticamente significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$), seguido de uma redução significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$). Para os restantes tratamentos C1, C2 e C4 não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$).

3.2.3. Amêijoia (*V. corrugata*)

Relativamente aos resultados obtidos para o meio de cultivo PCA (figura 14, letra E) e PCA 20 % (figura 14, letra F) para os tratamentos C2 e C4 não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p = 0.6422$; $p = 0.0590$, respetivamente).

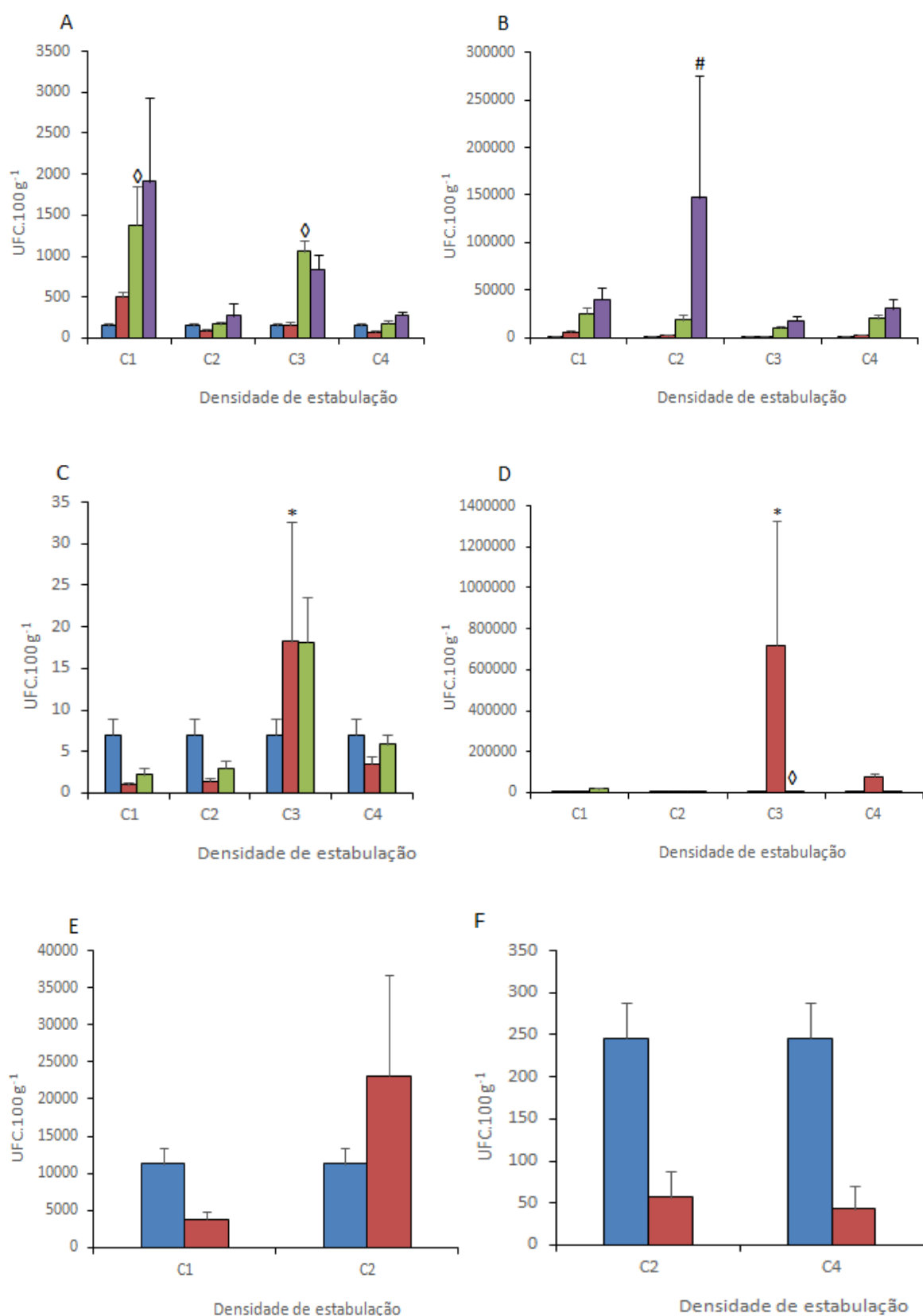


Figura 14. Efeito de diferentes cargas biológicas no processo de depuração do berbigão, da ostra e da amêijoia. As letras A e B correspondem às contagens de UFC para o berbigão em meio PCA e PCA 20%, respectivamente. As letras C e D correspondem às contagens de UFC para a ostra em meio PCA e PCA 20%, respectivamente. As letras E e F correspondem às contagens de UFC para a amêijoia em meio PCA e PCA 20%, respectivamente. As quatro colunas correspondem a diferentes tempos de depuração: 0h (azul), 12h (vermelho), 24h (verde) e 48h (roxo). Os símbolos *, \diamond e # definem diferenças estatisticamente significativas (D.S.) entre tempo de depuração de um mesmo tratamento (* D.S. entre as 0h e as 12h; \diamond D.S. entre as 12h e as 24h; # D.S. entre as 24h e as 48h).

3.3. Otimização da combinação de temperatura e salinidade ótimas

3.3.1. Berbigão (*C. edule*)

Relativamente aos resultados obtidos através do meio de cultivo PCA (figura 15, letra A) para os tratamentos T15;S35 e 15;S30, correspondentes à combinação 15 °C com salinidade 35 e 15 °C com salinidade 30 respetivamente, observou-se um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$). Para os tratamentos T18;S35 e T21;S25, correspondentes à combinação 18 °C com salinidade 35 e 21 °C com salinidade 25 respetivamente, observou-se um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$), seguido de um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$). Em relação aos restantes tratamentos T21;S35, T18;S30, T21;S30, T15;S25 e T18;S25, correspondentes à combinação 21 °C e salinidade 35, 18 °C e salinidade 30, 21 °C e salinidade 30, 15 °C e salinidade 25 e 18 °C e salinidade 25 respetivamente, não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$).

Para os resultados obtidos através do meio de cultivo PCA 20 % (figura 15, letra B) para os tratamentos T15;S35, T18;S35, T15;S30, T18;S30, T15;S25 e T18;S25, apenas se observou um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$). Para o tratamento T21;S35, apenas se registou um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$). Para os tratamentos T21;S30 e T21;S25 não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$).

3.3.2. Ostra (*C. gigas*)

Relativamente aos resultados obtidos através do meio de cultivo PCA (figura 15, letra C) para o tratamento T15;S35, apenas se observou uma diminuição significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$). Para os restantes tratamentos T18;S35, T21;S35, T15;S30, T18;S30, T21;S30, T15;S25, T18;S25 e T21;S25, apenas se observou uma redução significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$).

Relativamente aos resultados obtidos através do meio de cultivo PCA 20 % (figura 15, letra D) para os tratamentos T15;S35, T21;S35, T18;S30, T21;S30 e T21;S25 apenas se observou uma diminuição significativa entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$). Para o tratamento T18;S35, registou-se um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$), seguido de uma diminuição significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração. Em relação aos tratamentos T15;S30, T15;S25 e T18;S25, registou-se uma diminuição significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e 12h de depuração, seguido de um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$).

3.3.3. Amêijoia (*V. corrugata*)

Para os resultados obtidos através do meio de cultivo PCA (figura 15, letra E) para os tratamentos T15;S35, T18;S30, T21;S30 e T18;S25, apenas se registou um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$). Para o tratamento T21;S35, apenas se registou uma diminuição significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$). Relativamente aos restantes tratamentos T18;S35, T15;S30, T15;S25 e T21;S25 não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$).

Relativamente aos resultados obtidos através do meio de cultivo PCA 20 % (figura 15, letra F) para os tratamentos T15;S25 e T18;S25, apenas se observou um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$). Para os restantes tratamentos T15;S35, T18;S35, T21;S35, T15;S30, T18;S30, T21;S30 e T21;S25, não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$).

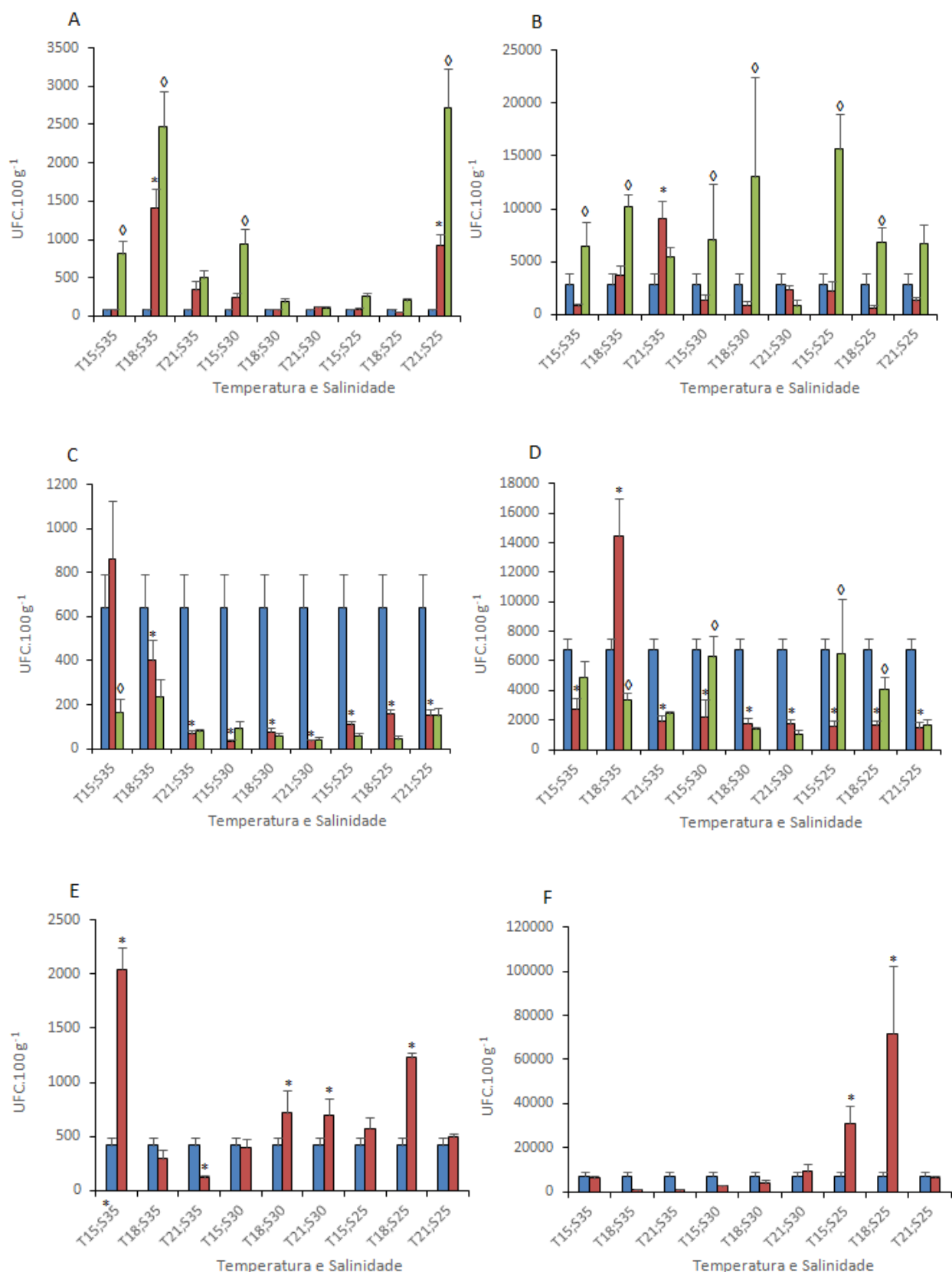


Figura 15. Efeito da combinação de diferentes valores de temperatura e salinidade no processo de depuração do berbigão, da ostra e da amêijoia. As letras A e B correspondem às contagens de UFC para o berbigão em meio PCA e PCA 20%, respectivamente. As letras C e D correspondem às contagens de UFC para a ostra em meio PCA e PCA 20%, respectivamente. As letras E e F correspondem às contagens de UFC para a amêijoia em meio PCA e PCA 20%, respectivamente. As três colunas correspondem a diferentes tempos de depuração: 0h (azul), 12h (vermelho) e 24h (verde). Os símbolos * e ◇ definem diferenças estatisticamente significativas (D.S.) entre tempo de depuração de um mesmo tratamento (* D.S. entre as 0h e as 12h; ◇ D.S. entre as 12h e as 24h).

3.4. Capacidade máxima de funcionamento da depuradora otimizada

3.4.1. Berbigão (*C. edule*)

Para o berbigão, relativamente aos resultados obtidos através do meio de cultivo PCA (figura 16, letra A), para os tratamentos V1 e V3, correspondentes a 180 L com equipamento UV de 25 W e 180 L com equipamento UV de 55 W respetivamente, não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$). Para os restantes tratamentos V2 e V4, correspondentes a 360 L com equipamento UV de 25 W e 360 L com equipamento UV de 55 W respetivamente, apenas se observou um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$).

Relativamente aos resultados obtidos através do meio de cultivo PCA 20 % (figura 16, letra B) para os quatro tratamentos V1, V2, V3 e V4, apenas se observou um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$).

3.4.2. Ostra (*C. gigas*)

Para a ostra, relativamente aos resultados obtidos através do meio de cultivo PCA (figura 16, letra C) para o tratamento V1, apenas existiu uma redução significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$). Para os restantes tratamentos V2, V3 e V4, apenas se observou uma redução significativa do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 0h e as 12h de depuração ($p < 0.05$).

Relativamente aos resultados obtidos através do meio de cultivo PCA 20 % (figura 16, letra D) para os tratamentos V1, V2 e V3, não se registaram diferenças significativas do valor de UFC.100g⁻¹ ($p > 0.05$). Para o tratamento V3, apenas se observou um aumento significativo do valor de UFC.100g⁻¹ entre as 12h e as 24h de depuração ($p < 0.05$).

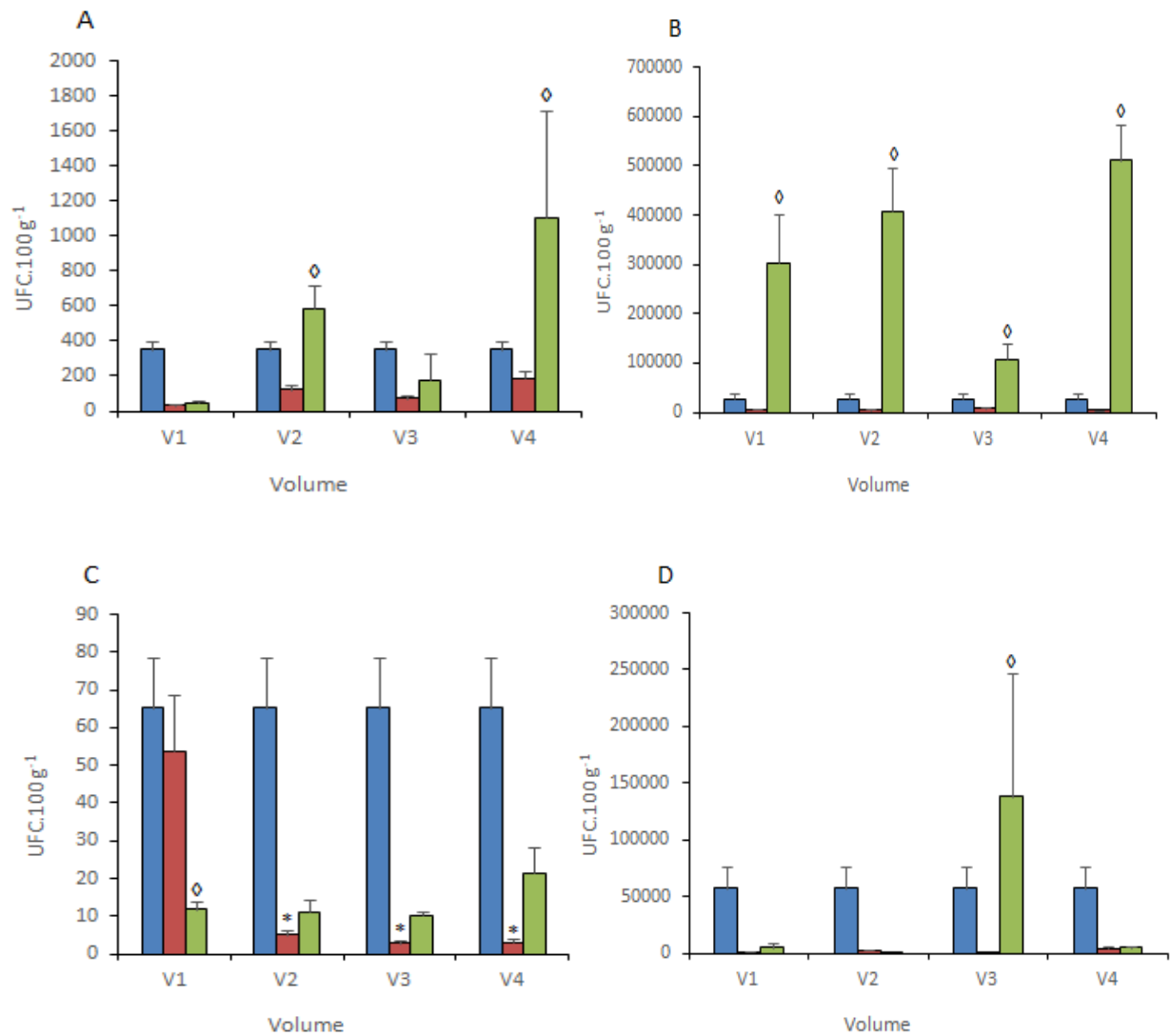


Figura 16. Efeito de diferentes volumes totais no processo de depuração do berbigão e da ostra. As letras A e B correspondem às contagens de UFC para o berbigão em meio PCA e PCA 20%, respectivamente. As letras C e D correspondem às contagens de UFC para a ostra em meio PCA e PCA 20%, respectivamente. Para os 4 gráficos, as colunas a azul definem a variação às 0h de depuração, a vermelho após 12h e a verde após 24h de depuração. Para todos os casos, os símbolos * \diamond definem diferenças estatisticamente significativas (D.S.) entre tempo de depuração de um mesmo tratamento (* D.S. entre as 0h e as 12h ; \diamond D.S. entre as 12h e as 24h).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este trabalho pretendeu identificar qual o melhor processo de depuração de moluscos bivalves, para a máxima eliminação de bactérias patogénicas ao menor custo possível.

Para monitorizar os processos de depuração procedeu-se à contagem de microrganismos totais usando um meio de cultura não seletivo, PCA agar. Uma vez que foi feita a análise do conteúdo microbiano de moluscos bivalves, organismos que vivem em ambiente marinho, foi também feita uma contagem de microrganismos totais com uso de PCA agar com 20 % NaCl, de forma a aproximar as condições de cultivo às características originais das amostras. No entanto, os resultados obtidos para o meio com NaCl não foram os melhores uma vez que foi necessário eliminar muitas réplicas pela impossibilidade de efetuar contagens. Por este motivo, uma diminuição do número de réplicas para cada tratamento implica um maior erro associado aos resultados obtidos pela análise dos gráficos.

O uso de radiação UV apresenta algumas desvantagens, nomeadamente a exigência de uma boa filtração física para remoção de material suspenso (Ostroumov, 2005; Barile et al., 2009). O uso de uma filtração por escumador pode não ter sido suficiente para manter a eficácia do processo de filtração por radiação UV. Esta possível diminuição da eficácia do equipamento UV pode explicar os vários aumentos de UFC ao longo do processo de depuração. De forma a prevenir esta possível diminuição da eficácia do equipamento UV, poder-se-ia ter associado ao sistema de depuração um filtro mecânico que garantisse a não deposição de compostos orgânicos na lâmpada UV.

Os resultados obtidos pela contagem de UFC em meio PCA agar e PCA agar com 20 % NaCl permitiram o estudo de microrganismos totais, ou seja, apenas nos permitiram perceber uma tendência de contaminação crescente/decrecente face ao valor inicial de contaminação (tempo 0h de depuração). Por este motivo, apenas podemos obter tendências sobre quais os métodos mais eficazes de depuração. De um modo geral, observou-se uma tendência positiva para a eliminação de microrganismos patogénicos já nas 12h de depuração, sugerindo que não é necessário o prolongamento deste processo por 24h ou 48h, o que pode contribuir para uma maior perda de peso e diminuição do valor nutricional e organolético dos moluscos depurados. A rápida redução de *E. coli* na

maioria dos processos de depuração dentro dos valores legislados confirma esta opção de curtos períodos de depuração (Croci et al., 2002). No entanto, tendo em conta que estes resultados correspondem a contagem de microrganismos totais, torna-se necessário ter em consideração o risco associado ao consumidor na possível permanência de microrganismos patogénicos.

Para o estudo da otimização da intensidade UV no processo de depuração, foram utilizados dois equipamentos distintos, um com uma lâmpada UV de 25 W e o outro equipamento com lâmpada UV de 55 W. De acordo com os resultados obtidos (figura 16) no caso do berbigão em PCA agar, facilmente se percebe que para todos os tratamentos existiu uma diminuição significativa do valor de UFC entre as 0h e as 12h, mas que apenas num dos tratamentos se obteve distinção dos valores de UFC entre as 12h e 24h (UV2 correspondente a $6.000 \mu\text{W.s/cm}^2$). Neste sentido, é possível observar uma tendência de que não foi necessário um período superior a 12h de depuração, sugerindo como método mais eficiente foi o associado ao equipamento de radiação 25 W, tratamento UV3, correspondente a $9.000 \mu\text{W.s/cm}^2$. Já para a ostra, é possível sugerir o método de depuração associado ao tratamento UV3 como o mais eficiente, mas após 24h, sugerindo a necessidade de prolongamento do processo de depuração por mais 12h. Estes resultados são contraditórios a outros estudos, na medida em que foi definido como tratamento mais eficaz o uso de um equipamento UV de 55 W (Sunnotel et. al., 2007). No entanto, estes resultados sugerem que pode não ser necessário o uso de um equipamento energeticamente mais caro para obtenção de uma depuração eficiente.

Foi posteriormente otimizada a densidade de estabulação, carga de moluscos bivalves no tanque de depuração, para as três espécies (figura 17). Neste caso é possível tirar uma conclusão comum às três espécies: em termos microbiológicos, valor de UFC.100g^{-1} , não é possível sugerir qual o tratamento mais eficiente, uma vez que não existe uma redução significativa do número de UFCs para nenhum dos casos, pelo que em termos económicos se pode traduzir na seleção do tratamento C4, correspondente à carga máxima 98 g/L para berbigão e amêijoia, e 120 unidades para a ostra, como o valor otimizado.

Também foi feita uma análise da combinação entre valores de temperatura e salinidade, dentro do intervalo de valores ótimos para cada espécie e de acordo com as condições usadas por entidades depuradoras. Neste sentido, seria de esperar que temperaturas mais elevadas, neste caso 21 °C, fossem mais eficientes na eliminação de microrganismos patogénicos (Loosanoff 1958; Brock et al., 1986), o que associado ao fator económico se torna mais rentável, pois torna-se desnecessário o uso de equipamentos de refrigeração da água. De acordo com os resultados obtidos (figura 18) podemos aferir para as três espécies que, de um modo geral, as 24h de depuração se mostraram desnecessárias. No caso específico do berbigão, uma vez mais não é possível sugerir qual o método através do qual existiu uma redução significativa do valor de UFC.100g⁻¹, podemos comparar os resultados com a temperatura 21 °C, e sugerir a combinação T21;S30, correspondente à combinação 21 °C com salinidade 30. Para a ostra é possível observar diferenças significativas entre as 0h e as 12h de depuração, em que uma vez mais o tratamento T21;S30 se apresenta mais eficiente, o que não vai de encontro aos resultados de (Chae et. al., 2009), em que a combinação de salinidade com temperatura 15 °C se provou mais eficiente. Relativamente ao que aconteceu para a amêijoia, onde apenas se estudou a variação entre as 0h e as 12h de depuração, é possível observar que a diferença mais significativa do valor de UFC.100g⁻¹ se encontra associada ao tratamento T21;S35, correspondente à combinação 21 °C com salinidade 35.

Uma vez que uma parte dos objetivos reside em tentar associar o menor custo à maior eliminação de microrganismos patogénicos, foi também estudada a eficácia do sistema de depuração otimizado com o tanque meio cheio, 90 L, e com um volume máximo de água, 180 L. De forma a estudar o comportamento para todos os equipamentos, realizou-se esta variação associada aos dois equipamentos de UV, UV 25 W e UV 55 W. Através da análise dos gráficos (figura 19) para o berbigão não se consegue obter um tratamento claramente mais eficiente do que os outros, pelo que se sugere o método mais rentável, V2 – 180 L com UV 25 W, como o valor otimizado do volume. Relativamente ao que aconteceu para a ostra, é possível considerar a opção V2 unânime para as duas espécies.

Uma vez que existem cada vez mais estudos que comprovam a eficácia na depuração de moluscos bivalves a temperaturas mais elevadas (Polo et al., 2014) bem como a necessidade de aproximar as características da água de depuração às condições ambientais onde a espécie reside (Albuquerque et al., 2012), torna-se essencial a continuação de estudos deste tipo para outras espécies. Desta forma será possível saber qual a combinação de fatores ótima para cada espécie de molusco bivalve, para uma depuração mais eficiente.

De acordo com os critérios descritos na legislação portuguesa para o processo de depuração de moluscos bivalves, foi realizado um estudo para a presença de *E. coli*, o bioindicador de contaminação fecal. Mas tal como descrito por vários estudos, a ausência desta bactéria nem sempre está associada à ausência de outras bactérias, como *Salmonella* spp. ou *Vibrio* spp. (Girones et al., 2010; Carraro et al., 2015) o que a torna também ineficaz na avaliação da eficácia do processo de depuração (Crocì et al., 2002).

Neste sentido, para além da presença de *E. coli*, também foi estudada a presença de outras duas bactérias, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp. No entanto, não foi possível obter nenhum resultado positivo da presença destas bactérias, quer nos moluscos bivalves utilizados nas experiências de otimização, quer no ensaio com moluscos bivalves do mercado. Uma vez que se obteve ausência destas bactérias em ambas as situações, pode-se confirmar que este método de depuração cumpriu com os parâmetros legais para consumo humano.

Estas experiências foram realizadas ao longo de um período de 6 meses, de setembro a fevereiro (por razões logísticas associadas ao projeto Depurplus), que correspondeu a um inverno atípico com ausência de enxurradas, fator este que potencia a contaminação por parte de *E. coli* (Campos et al., 2013).

Este período de apenas 6 meses também pode explicar a ausência das outras duas espécies, *Salmonella* spp. e *Vibrio* spp., pois a comunidade bacteriana em geral apresenta sazonalidade, o que exige que estes estudos sejam feitos ao longo de pelo menos 1 ano, de modo a obter resultados conclusivos (Pereira, 2009; Matias, 2013).

Apesar de não se ter obtido crescimento para *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. e *E. coli* é preciso ter em conta que, apesar do uso de meios enriquecidos e específicos, a sua

concentração pode ser muito baixa e não produzir crescimento, no entanto esta concentração já pode ser suficiente para causar infeções (Girones et al., 2010).

Através deste trabalho foi possível obter valores ótimos para os vários parâmetros do processo de depuração, no entanto ainda existe uma falta de estudos considerável nesta área, pelo que a otimização deste processo para mais espécies, bem como a aplicação de medidas de regulamentação a nível industrial tornam-se urgentes.

Visto que aos consumidores devem chegar produtos alimentares frescos, saborosos e saudáveis, torna-se um desafio a regulação microbiológica de controlo efetivo, sem que haja necessidade de aumentar os custos ou reduzir o sabor e valor nutricional dos alimentos (Havelaar et. al., 2010). De modo a proteger os consumidores de infeções bacterianas, seria vantajoso não só a promoção de campanhas para informação pública dos cuidados a ter na conservação e consumo de moluscos bivalves, mas acima de tudo estabelecer controlos de rotina na identificação direta de microrganismos patogénicos (Crocì et. al, 2002).

Com um maior controlo na qualidade dos moluscos bivalves, torna-se exequível reduzir os problemas de saúde associados ao seu consumo, representando uma significativa redução de gastos neste sector.

A otimização deste processo contribui sem dúvida para a contenção de gastos no processo de depuração, não só pela redução do tempo de depuração para 12h, como também na utilização de um equipamento UV de 25 W, mais eficiente em termos energéticos que o uso de uma lâmpada de 55 W. A existência de resultados conclusivos para a densidade de estabulação permitiu também sugerir o tratamento de maior carga biológica como o mais eficiente. Para além disto, os resultados satisfatórios associados a temperaturas mais elevadas, 21 °C, permitiu sugerir uma redução de custos na refrigeração da água de depuração.

Como conclusão, este estudo também permitiu uma vez mais confirmar a não fiabilidade do uso de *E. coli* como método de avaliação da qualidade deste processo, uma vez que se obteve tendências de contaminação que não foram associadas à presença desta bactéria.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(2014). Controlo oficial de moluscos bivalves vivos - Guia de orientação. D. d. S. d. S. Alimentar, Direção Geral de Alimentação e Veterinária: 13.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., e Morgan, D. (2014). *Molecular Biology of the Cell* [PDF]. Disponível em https://books.google.pt/books?id=jK6UBQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=molecular+biology+of+the+cell&hl=ptPT&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=molecular%20biology%20of%20the%20cell&f=false.

Albuquerque, M. C. P., Ferreira, J. F., Salvador, G. C., e Turini, C. (2012). Influência da temperatura e da salinidade na sobrevivência e crescimento de larvas da ostra perliífera *Pteria hirundo*. *Boletim do instituto de pesca*, 38(3), páginas 189-197. Disponível em ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/38_3_189-197.pdf.

Amoroux, I., e Dominique S. (2011). Comparison of microbiological contamination level between different species of shellfish. *Ifremer*. Disponível em: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00176/28731/27199.pdf>.

Anacleto, P., Maulvault A. L., Chaguri M., e Pedro, S. (2013). Microbial responses to depuration and transport of native and exotic clams at optimal and stressful temperatures. *Food microbiology*, 36(2), páginas 365-373. doi: 10.1016/j.fm.2013.07.002.

Anacleto, P., Pedro, S., Nunes, M. L., e Marques, A. (2013). Microbiological composition of native and exotic clams from Tagus estuary: Effect of season and environmental parameters. *Marine Pollution Bulletin*, 74(1), páginas 116-124. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.07.019.

Asplund, M. E. (2013). *Ecological aspects of marine Vibrio bacteria: Exploring relationships to other organisms and a changing environment*. (Tese de Doutoramento, Universidade de Kristineberg). Disponível em: https://gupea.ub.gu.se/bitstream/2077/31813/3/gupea_2077_31813_3.pdf.

Bakr, W. M., Hazzah, W. A., e Abaza, A. F. (2011). Detection of *Salmonella* and *Vibrio* species in some seafood in Alexandria. *Journal of American Science*, 7(9), páginas 663-668. Disponível em

https://www.researchgate.net/publication/262911976_Detection_of_Salmonella_and_Vibrio_species_in_some_seafood_in_Alexandria.

Barile, N. B., Scopa, M., Nerone, E., e Mascilongo, G. (2009). Study of the efficacy of a closed cycle depuration system on bivalve molluscs. *Veterinaria Italiana*, 45(4), páginas 555-566. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20391418>.

Bettega, J. M. P. R., Machado, M. R., Presibella, M., e Barbosa, C. A. (2006). Analithical methods for water microbiological control for human consumption. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(5), páginas 950-954. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v30n5/v30n5a19.pdf>.

Breitwieser, M., Viricel, A., Graber, M., Murillo, L., Becquet, V., Churlaud, C., ... Thomas-Guyon, H. (2016). Short-Term and Long-Term Biological Effects of Chronic Chemical Contamination on Natural Populations of a Marine Bivalve. *PLOS One*, 11(3), páginas 1-24. doi: 10.1371/journal.pone.0150184.

Brock, V., Kennedy, V. S., e Brock, A. (1986) Temperature dependency of carbohydrase activity in the hepatopancreas of thirteen estuarine and coastal bivalve species from the North American east coast. *Journal of Experimental Marine Biology*, 103(1-3), páginas 87-101. doi: 10.1016/0022-0981(86)90134-6.

Butt, A. A., Aldridge, K. E., e Sander, C. V. (2004). Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections. *Lancet Infectuous Diseases*, 4(4), páginas 201-212. doi: 10.1016/S1473-3099(04)00969-7.

Campos, C. J., Acornley, R., Morgan, O. C., e Kershaw, S. (2013). Trends in the levels of *Escherichia coli* in commercially harvested bivalve shellfish from England and Wales, 1999–2008. *Marine Pollution Bolletin*, 67(1-2), páginas 223-227. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.11.030.

- Carraro, V., Sanna, C., Brandas, V., e Sanna, A. (2015). Hygiene and health risks associated with the consumption of edible lamellibranch molluscs. *International Journal of Food Microbiology*, 201, páginas 52-57. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.014.
- Chae, M. J., Cheney, D., e Su, Y. C. (2009). Temperature effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of Food Science*, 74(2), páginas 62-66. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.01031.x.
- Coles, J. A., Farley, S. R., e Pipe, R. K. (1994). Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 30(4), páginas 367-379. doi: 10.1016/0166-445X(94)00051-4.
- Corrêa, A. A., Albarnaz, J. D., Moresco, V., e Poli, C. R. (2007). Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Marine Environmental Research*, 63(5), páginas 479-489. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.12.002>.
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, L., e Toti, L. (2002). Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, páginas 460-465. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01548.x.
- De Paola, A., Jones, J. L., Woods, J., Burkhardt III, W., Calci, K. R., ... Nabe, K. (2010). Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), páginas 2754-2768. doi: 10.1128/AEM.02590-09.
- Dame, R. F., e Olenin, S. (2005). *The comparative Roles of Suspension-Feeders in Ecosystems* [PDF]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/295547693>.
- DGRM. (2014). Plano Estratégico para a Aquicultura Portuguesa, 2014-2020. Disponível em <http://eaquicultura.pt/plano-estrategico-para-a-aquicultura-portuguesa-2014-2020/>.
- Ehrich, M. K., e Harris, L. A. (2015). A review of existing eastern oyster filtration rate models. *Ecological Modelling*, 297. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2014.11.023.

FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security and nutrition for all. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e.pdf>.

Feng, S. Y. (1988). Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *American Fisheries Society*, 18, páginas 153-168. Disponível em https://www.researchgate.net/publication/284052001_Cellular_defense_mechanisms_of_oysters_and_mussels.

Fong, T., e Lipp, E. K. (2005). Enteric viruses of human and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), páginas 357-371. doi: 10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005.

Geffard, O., Budzinski, H., e His, E. (2002). The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology*, 11(6), páginas 403-416. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12521137>.

Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodrigues-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A. A., ..., Bofill-Mas, S. (2010). Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Research*, 44(15), páginas 4325-4339. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135410004173>.

Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M. L., e Novoa, B. (2005). Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), páginas 98-104. doi: 10.1128/AEM.71.1.98-104.2005.

Hamdan, L. J., Coffin, R. B., Sikaroodi, M., e Greinert, J. (2013). Ocean currents shape the microbiome of Arctic marine sediments. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 7, páginas 685-696. doi: 10.1038/ismej.2012.143.

Hassard, F., Gwyther, C. L., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., ... Malham, S. K. (2016). Abundance and distribution of enteric bacteria and viruses in coastal and

estuarine sediments – a review. *Frontiers in Microbiology*, 7(1682). doi: 10.3389/fmicb.2016.01692.

Havelaar, A. H., Brul, S., Jong, A., e Jonge, R. (2010). Future challenges to microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 139, páginas S79-S94. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.015.

Hoffman, J. (2010). *Primitive immune systems*. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.0134.x.

INE. (2014). Portal do Instituto Nacional de Estatística. Disponível em <http://www.ine.pt/>.

IPMA. (2016). Instituto Português do Mar e da Atmosfera. Disponível em <http://ipma.pt/>.

Ishii, S., Sadowsky, M. J. (2008). *Escherichia coli* in the environment: implications of water quality and human health. *Microbes Environment*, 23(2), páginas 101-108. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.0134.x.

Iwamoto, M., Ayers, T., Mahon, B. E., e Swerdlow, D. L. (2010). Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), páginas 399-411). doi: 10.1128/CMR.00059-09.

Kueh, C. S. W., e Chan, K. (1985). Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *Journal of Applied Bacteriology*, 59(1), páginas 41-47. doi: 10.1111/j.1365-2672.1985.tb01773.x.

Lee, R. J., Younger, A. D. (2002). Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(3-4), páginas 177-183. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830502000847>.

Lees, D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1-2), páginas 81-116. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00248-8.

Lobo, J., Costa, P. M., Caeiro, S., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., ... Costa, M. H. (2010). Evaluation of the potential of the common cockle (*Cerastoderma edule* L.) for the

ecological risk assessment of estuarine sediments: bioaccumulation and biomarkers. *Ecotoxicology*, 19(8), páginas 1496-1512. doi: 10.1007/s10646-010-0535-7.

Loosanoff, V. L. (1958). Some aspects of behavior of oysters at different temperatures. *The Biological Bulletin*, 114(1), páginas 57-70. doi: 10.2307/1538965.

Love, D. C., Lovelace, G. L., e Sobsey, M. D. (2010). Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), páginas 211-217. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.028.

Matias, A. G. M. (2013). *Influência da variação sazonal no valor nutricional e avaliação da estabilidade da amêijoia-boia produzida em aquacultura* (Dissertação de mestrado, Instituto Politécnico de Leiria). Disponível em <https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/1062/1/Projeto%20Marta%20Matias.pdf>.

Miranda, J. M. (2013). Diário da República, 2ª série – Nº 227 – Despacho nº 15264/2013. *Instituto Português do Mar e da Atmosfera*. Disponível em https://www.ipma.pt/export/sites/ipma/bin/docs/institucionais/desp.15264.2013_zonas.pdf.

Murchie, L. W., Cruz-Romero, M., Kerry, J. P., e Linton, M. (2005). High pressure processing of shellfish: A review of microbiological and other quality aspects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(3), páginas 257-270. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856405000457>.

Nunes, M. L., Batista, I., Bandarra, N. M. (2008). Produtos da pesca: valor nutricional e importância para a saúde e bem-estar dos consumidores. *Publicações avulsas do IPIMAR*, Lisboa.

Officer, C. B., Smayda, T. J., e Mann, R. (1982). Benthic filter feeding: a natural eutrophication control. *Marine Ecology Progress Series*, 9(2), páginas 203-210. Disponível em <http://www.int-res.com/articles/meps/9/m009p203.pdf>.

- Oliveira, J., Cunha, A., Castilho, F. e Romalde, J. L. (2011). Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives - A mini-review. *Food Control*, 22(6), páginas 805-816. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.032.
- Ostroumov, S. A. (2005). Some aspects of water filtering activity of filter-feeders. *Hydrobiologia*, 542, páginas 275-286. doi: 10.1007/s10750-004-1875-1.
- Pachepsky, Y. A., e Shelton, D. R. (2011). Escherichia coli and fecal coliforms in freshwater and estuarine sediments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(12), páginas:1067-1110. doi:10.1080/10643380903392718.
- Pandian, T. J. (1987). *Animal Energetics: Bivalvia through reptilia*. Disponível em: https://books.google.pt/books?id=7ZjwAAAAMAAJ&q=Animal+Energetics:+Bivalvia+through+reptilia.&dq=Animal+Energetics:+Bivalvia+through+reptilia.&hl=pt-PT&sa=X&redir_esc=y
- Paul-Pont, I., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Jude, F., Raymond, N., Bourrasseau, L., ... Montaudouin, X. (2010). Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the marine bivalve *Cerastoderma edule*. *Marine Pollution Bulletin*, 60(4), páginas 515-525. doi: 10.1016/j.marpolbul.2009.11.013.
- Pereira, C. S. G. (2009). *Uso de bacteriófagos na inativação de bactérias patogénicas num sistema de aquacultura* (Dissertação de mestrado, Universidade de Aveiro. Disponível em <http://ria.ua.pt/handle/10773/4511>.
- Pereira, C., Moreirinha, C., Rocha, R. J. M., e Calado, R. (2016). Application of bacteriophages during depuration reduces the load of *Salmonella Typhimurium* in cockles. *Food Research International*, 90, páginas 73-84. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.031>.
- Perkins, T. L., Clements, K., Baas, J. H., e Jago, C. F. (2014). Sediment composition influences spatial variation in the abundance of human pathogen indicator bacteria within an estuarine environment. *PLoS ONE* 9(11). doi: 10.1371/journal.pone.0112951.

Pipe, R. K., e Coles, J. A. (1995). Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*, 5, páginas 581-595. doi: 10.1016/S1050-4648(95)80043-3.

Polo, D., Álvarez, C., Díez, J., e Darriba, S. (2014). Viral elimination during commercial depuration of shellfish. *Food control*, 43, páginas 206-212. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514001479>.

Prado, S., Romalde, J. L., Montes, J., e Barja, J. L. (2005). Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67(3), páginas 209-215. doi: 10.3354/dao067209.

Randall, D., Burggren, W., e French, K. (1997). *Eckert Animal Physiology*[PDF]. Disponível em: https://books.google.pt/books/about/Eckert_Animal_Physiology.html?id=xKc1nwEACAAJ&redir_esc=y.

Rees, G., Pond, K., Kay, D., e Bartram, J. (2013). *Safe Management of Shellfish and Harvest Waters*. doi: 10.2166/9781780405797.

Renault, T. (2011). Effects of pesticides on marine bivalves: What do we know and what do we need to know?. In M. Stoytcheva (Ed.), *Pesticides in the Modern World – Risks and Benefits* (páginas 227-240). Disponível em <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-risksand-benefits/effects-of-pesticides-on-marine-bivalves-what-do-we-know-and-what-do-we-need-to-know>.

Romero, S. M. B., e Moreira, G. S. (1981). Efeitos combinados de salinidade e temperatura na sobrevivência de embriões e veligers de *Perna perna* (Linné, 1758) (Mollusca-Bivalvia). *Boletim de Fisiologia Animal da Universidade de São Paulo*, 5, páginas: 45-58.

Saavedra, Y., González, A., Fernández, P., e Blanco, J. (2004). Interspecific variation of metal concentrations in three bivalve mollusks from Galicia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(3), páginas 341-351. doi: 10.1007/s00244-004-3021-5.

Suffredini, E., Lanni, L., Arcangeli, G., e Pepe, T. (2014). Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 184, páginas 21-26. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.026.

Sunnotel, O., Snelling, W. J., McDonough, N., e Browne, L. (2007). Effectiveness of standard UV depuration at inactivating *Cryptosporidium parvum* recovered from spiked pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), páginas 5083-5087. doi: 10.1128/AEM.00375-07.

Thompson, F. L., Iida, T., e Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), páginas 403-431. doi: 10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004.

Walsh, E. A., Kirkpatrick, J. B., Rutherford, S. D., e Smith, D. C. (2016). Bacterial diversity and community composition from seasurface to subseafloor. *International Society for Microbial Ecology Journal* 10(4), páginas 979-989. doi: 10.1038/ismej.2015.175.

WoRMS. (2016). World Register of Marine Species. Disponível em <http://www.marinespecies.org>.

Zinger, L., Amaral-Zettler, L. A., Furrman, J. A., Horner-Devine, M. C., Huse, S. M., Welch, D. B. M., ... Ramete, A. (2011). Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS One* 6(9). doi: 10.1371/journal.pone.0024570.

6. ANEXOS

Anexo I. Valores relativos às ANOVAs efetuadas

Encontram-se abaixo os valores para graus de liberdade, valor de F e valor de p associados a cada fórmula de ANOVA, para cada espécie, tratamento e meio de cultura.

Espécie	Tratamento	Meio de cultura	Fórmula de ANOVA fatorial		
			Graus de liberdade	Valor de F	Valor de p
Berbigão (<i>Cerastoderma edule</i>)	UV	PCA	(6, 68)	6.831	p < 0.05
		PCA 20%	(6, 45)	14.473	p < 0.05
	Carga	PCA	(9, 80)	13.625	p < 0.05
		PCA 20%	(9, 77)	4.781	p < 0.005
	Volume	PCA	(6, 58)	13.111	p < 0.005
		PCA 20%	(6, 54)	27.306	p < 0.005
	Temperatura e salinidade	PCA	(8, 146)	97.394	p < 0.005
		PCA 20%	(8, 122)	6.462	p < 0.005
Ostra (<i>Crassostrea gigas</i>)	UV	PCA	(6, 51)	12.486	p < 0.005
		PCA 20%	(6, 52)	7.914	p < 0.005
	Carga	PCA	(6, 55)	6.139	p < 0.005
		PCA 20%	(6, 46)	6.338	p < 0.005
	Volume	PCA	(6, 52)	15.513	p < 0.005
		PCA 20%	(6, 47)	6.935	p < 0.005
	Temperatura e salinidade	PCA	(8, 123)	9.178	p < 0.005
		PCA 20%	(8, 138)	31.873	p < 0.005
Amêijoia (<i>Venerupis corrugata</i>)	UV	PCA	Não aplicável		
		PCA 20%			
	Carga	PCA	(1, 19)	0.223	p = 0.6422
		PCA 20%	(1, 12)	4.368	p = 0.0590
	Volume	PCA	Não aplicável		
		PCA 20%			
	Temperatura e salinidade	PCA	(4, 69)	127.651	p < 0.005
		PCA 20%	(4, 39)	11.630	p < 0.005

Anexo II. Tabela com informação comercial das amostras de controlo de mercado

Amostra	Nome comum	Nome científico	Depuradora	Lote	Data de embalagem	Local de captura	Local de compra	Zona de pesca
1	Ameijoa japónica	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Aki-D'el-Mar	S8934	27-04-2016	Estuário do Sado	Continente	B
2	Berbigão	<i>Cerastoderma edule</i>	Âncora-Mar	20716	27-04-2016	Ria de Aveiro	Pingo-Doce	B
3	Berbigão	<i>Cerastoderma edule</i>	Âncora-Mar	20516	25-04-2016	Ria de Aveiro	Pingo-Doce	B
4	Ameijoa boa	<i>Ruditapes decussatus</i>	Aki-D'el-Mar	02323	26-04-2016	Tunísia aquicultura	Continente	B
5	Berbigão	<i>Cerastoderma edule</i>	Companhia Pescarias do Algarve	L112702	26-04-2016	Aquicultura (Portugal)	Jumbo	A
6	Ameijoa japónica	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Âncora-Mar	38416	26-04-2016	Estuário do Sado – Canal de Alcácer	Jumbo	Sem informação
7	Ameijoa japónica	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Âncora-Mar	38416	25-04-2016	Estuário do Sado – Canal de Alcácer	Jumbo	Sem informação
8	Ameijoa boa	<i>Ruditapes decussatus</i>	(não identificada)	15/060194	27-04-2016	Portugal	Continente	Sem informação
9	Longueirão	<i>Solen spp.</i>	Companhia Pescarias do Algarve	L112802NP	27-04-2016	Sem informação	Continente	Sem informação
10	Ameijoa cão	<i>Venerupis aurea</i>	Formosa “Depuradora do Povo”	4.060709OLH5	28-04-2016	Ria Formosa (Algarve)	Depuradora do Povo	Sem informação
11	Berbigão	<i>Cerastoderma edule</i>	Formosa “Depuradora do Povo”	14.009625OLH5	28-04-2016	Ria Formosa (Algarve)	Depuradora do Povo	Sem informação
12	Longueirão	<i>Ensis spp.</i>	Formosa “Depuradora do Povo”	13.262677OLH5	28-04-2016	Ria Formosa (Algarve)	Depuradora do Povo	Sem informação